



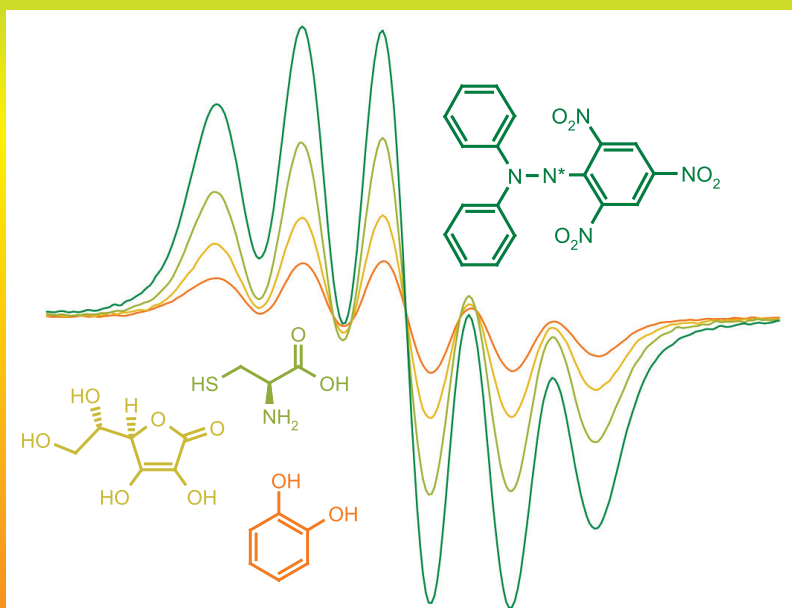
Уральский
федеральный
университет

имени первого Президента
России Б.Н. Ельцина

Химико-
технологический
институт

ЭПР-СПЕКТРОСКОПИЯ, ЭЛЕКТРОХИМИЧЕСКИЕ И КОМБИНИРОВАННЫЕ МЕТОДЫ АНАЛИЗА

Учебно-методическое пособие



МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ И НАУКИ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
УРАЛЬСКИЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
ИМЕНИ ПЕРВОГО ПРЕЗИДЕНТА РОССИИ Б. Н. ЕЛЬЦИНА

ЭПР-СПЕКТРОСКОПИЯ, ЭЛЕКТРОХИМИЧЕСКИЕ И КОМБИНИРОВАННЫЕ МЕТОДЫ АНАЛИЗА

Учебно-методическое пособие

Рекомендовано
методическим советом Уральского федерального университета
в качестве учебно-методического пособия для студентов вуза,
обучающихся по направлениям подготовки
18.03.01, 18.04.01 «Химическая технология», 04.04.01 «Химия»

Екатеринбург
Издательство Уральского университета
2018

УДК 544.6(07) + 543.42(07)
Э725

А в т о р ы:
А. Н. Козицина, А. В. Иванова, Ю. А. Глазырина,
А. Н. Цмокалюк, А. В. Ивойлова, А. С. Петров

П о д о б щ е й р е д а к ц и е й
Ю. А. Глазыриной

Р е ц е н з е н т ы:
кафедра химии Уральского государственного горного университета
(заведующий кафедрой доктор технических наук, профессор А. М. Амдур);
А. Ю. Сунцов, кандидат химических наук, старший научный сотрудник
лаборатории оксидных систем Института химии твердого тела УрО РАН

Э725 **ЭПР-спектроскопия, электрохимические и комбинированные методы**
анализа : учеб.-метод. пособие / [А. Н. Козицина, А. В. Иванова, Ю. А. Глазырина, А. Н. Цмокалюк, А. В. Ивойлова, А. С. Петров ; под общ. ред. Ю. А. Глазыриной] ; М-во образования и науки Рос. Федерации, Урал. федер. ун-т. – Екатеринбург : Изд-во Урал. ун-та, 2018. – 60 с.

ISBN 978-5-7996-2426-2

В учебно-методическом пособии приводятся теоретические основы электрохимических методов анализа (хроноамперометрия, хронопотенциометрия, вольтамперометрия, кулонометрия, импедансная спектроскопия) и СВ-ЭПР-спектроскопии, а также методы анализа и моделирования ЭПР-спектра. Для закрепления материала предложены пять лабораторных занятий.

Предназначено для студентов, изучающих дисциплины, входящие в модули «Аналитическая химия и физико-химические методы анализа», «Физико-химические науки».

УДК 544.6(07) + 543.42(07)

ОГЛАВЛЕНИЕ

Введение	4
1. Теоретические основы метода ЭПР	6
2. Основы работы с программно-аппаратным комплексом «ELEXSYS E500»	15
<i>Лабораторная работа 1. Определение антирадикальной активности индивидуальных антиоксидантов методом ЭПР-спектроскопии</i>	<i>21</i>
3. Теоретические основы метода вольтамперометрии	24
<i>Лабораторная работа 2. Определение количества электронов, участвующих в процессе восстановления препарата Триазавирин[®], с помощью электрохимических методов</i>	<i>28</i>
<i>Лабораторная работа 3. Регистрация радикала в препарате Триазавирин[®] с использованием ЭХ-анализатора и ЭПР-спектрометра</i>	<i>41</i>
<i>Лабораторная работа 4. Регистрация радикального интермедиата молекулы препарата Триазавирин[®] методом спиновой ловушки</i>	<i>47</i>
<i>Лабораторная работа 5. Использование программного модуля EasySpin для моделирования спектров ЭПР</i>	<i>50</i>
Библиографические ссылки	56
Список рекомендуемой литературы	57

ВВЕДЕНИЕ

Явление электронного парамагнитного резонанса (ЭПР) заключается в резонансном поглощении электромагнитного излучения в диапазоне радиочастот веществами, помещенными в постоянное магнитное поле, и обусловлено квантовыми переходами между энергетическими подуровнями, связанными с наличием магнитного момента у электронных систем. Также ЭПР называют электронным спиновым резонансом (ЭСР), магнитным спиновым резонансом (МСР).

Электронный парамагнитный резонанс как метод исследования был разработан Е. К. Завойским с сотрудниками С. А. Альтшулером и Б. М. Козыревым в 1944 г. в Казани. Созданию метода предшествовали открытие спина электрона, эффекта Зеемана, а также длительная работа, направленная на поиск возможности использования полей радиочастотного диапазона для исследования веществ.

Метод электронного парамагнитного резонанса применяется для исследования парамагнитных центров и их окружения в веществе, с его помощью можно определять концентрацию и идентифицировать парамагнитные частицы в любом агрегатном состоянии. Он позволяет детектировать свободные радикалы в количестве до 10^{-10} моля [1].

Применение метода ЭПР помогает исследовать:

- атомы или молекулы с нечетным числом электронов (например, атомы водорода, азота, молекулы NO);
- свободные радикалы в газовой, жидкой и твердой фазах;
- ионы с частично заполненными электронными оболочками (например, ионы переходных элементов);
- точечные дефекты и примесные атомы в твердых телах;
- системы в триплетном состоянии;
- радиационные дефекты в кристаллах полупроводников и диэлектриков;
- электроны проводимости в металлах и полупроводниках и т. д.

В химии методикой ЭПР исследуют электронное распределение и структуру парамагнитных комплексов, участвующих в химических и электрохимических реакциях, методика используется также для определения структур молекул в возбужденных триплетных состояниях и изучения кинетики реакций, идущих с образованием радикалов.

В биологии ЭПР применяют при исследовании:

- радикалов, возникших в результате повреждающего воздействия ионизирующего излучения на биологические объекты;

– парамагнитных частиц, образовавшихся при фотохимическом окислении хлорофилла;

– ионов переходных металлов (Fe, Co, Ni, Cu, Mn), входящих в состав биологически важных молекул и комплексов.

Исследования ЭПР проводят с жидкими и твердыми образцами, реже – с газообразными. При работе с жидкими образцами целесообразнее использовать неполярные органические растворители, так как увеличение диэлектрической проницаемости приводит к ухудшению аналитического сигнала. Для твердых образцов наиболее перспективно использование монокристаллов, однако из-за трудности их получения чаще работают с замороженными растворами (стеклами) или поликристаллическими порошками. Для снижения спин-спинового взаимодействия часто используют совместную кристаллизацию парамагнитного вещества с диамагнитными веществами, образующими с ним изоморфные кристаллы.

Ограничением метода ЭПР является малое число объектов исследования, поскольку большинство ионов металлов и органических веществ диамагнитно. К тому же линии парамагнитных ионов широки вследствие вклада орбитальной составляющей в магнитный момент. Часто их трудно использовать для чувствительных аналитических определений. Избежать этих недостатков позволяет использование комплексообразования диамагнитных ионов с органическими лигандами, являющимися стабильными свободными радикалами (спин-меченые реагенты). В этом случае концентрацию диамагнитного иона определяют по парамагнетизму органической части компонентов соединения. Использование спин-меченых реагентов делает метод ЭПР универсальным, метод становится пригодным для определения ионов в любой степени окисления, как парамагнитных, так и диамагнитных. Кроме того, спектры ЭПР с реагентом-радикалом характеризуются более узкими линиями, что существенно повышает чувствительность определения металлов.

Применение ЭПР для исследования комплексообразования парамагнитных ионов открывает большие возможности для решения многих вопросов химии координационных соединений: о способе координации лиганда, содержащего несколько донорских атомов; о числе и эквивалентности донорских атомов, входящих в состав внутренней координационной сферы (по числу линий расщепления спектра СТВ (сверхтонкое взаимодействие)); о различиях в составе комплексных соединений в твердом и жидком состояниях (по характеру спектров ЭПР при варьировании температуры).

1. ТЕОРЕТИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ МЕТОДА ЭПР

Магнитные моменты атомов и молекул определяют магнитные свойства веществ. В свою очередь, магнитные моменты электронов и нуклонов (протонов и нейтронов) формируют магнетизм атомов и молекул. Магнитный момент атомного ядра меньше магнитного момента электрона, вот почему вклад в магнитные свойства веществ с большим приближением определяется магнитными моментами электронов. Магнитный момент электрона в атоме связан с орбитальным механическим моментом в соответствии с гиромагнитным отношением. Дополнительно к механическому моменту электрону присущ спин, собственный механический момент.

В квантовой теории проекция орбитального момента импульса на заданную ось (z) и его квадрат могут принимать лишь дискретные значения:

$$l_z = m_l h, \quad (1)$$

где $m_l = -l, \dots, l$,

$$l^2 = l(l+1)h^2, \quad (2)$$

где m_l и l – магнитное и орбитальное квантовые числа; $h = 1,05 \cdot 10^{-34}$ Дж · с – постоянная Планка.

Орбитальному движению электрона соответствует магнитный момент, проекцию которого можно выразить через гиромагнитное отношение:

$$\mu_z = \gamma m_l = -\beta m_l, \quad (3)$$

где γ – гиромагнитное отношение электрона; β – магнетон Бора: $\beta = eh/(2m_e) = 9,274 \cdot 10^{-24}$ Дж/Тл.

Как уже отмечалось, электрон обладает собственным механическим моментом – спином. Соответственно со спиновым движением связан собственный магнитный момент электрона. Проекция спина и спинового магнитного момента:

$$S_z = m_s h, \quad (4)$$

где $m_s = -s, \dots, s$,

$$\mu_z^s = -2\beta m_s, \quad (5)$$

где s – спиновое квантовое число электрона, $s = 1/2$.

Следует отметить, что для спинового момента гиромагнитное отношение больше в два раза, чем для орбитального.

Если атом содержит несколько электронов, то орбитальные и спиновые моменты электронов, составляющих атом, складываются: $L = \sum l_i$, $S = \sum S_i$;

такое взаимодействие характерно для большинства элементов. Тогда магнитные свойства частицы будут определяться значениями квантовых чисел L и S , характеризующих суммарные орбитальные и спиновые моменты движения электронов атома.

Полный механический момент частицы $J = L + S$ складывается из ее спинового и орбитального моментов, аналогично формируется и полный магнитный дипольный момент. Величина полного магнитного дипольного момента будет отличаться от спинового или орбитального значений. Поэтому вводится g -фактор свободного атома или иона, вычисляемый согласно формуле Ланде, который оценивает вклад орбитальной и спиновой составляющей магнитных моментов в полный магнитный момент.

Для неспаренного электрона в молекулярном радикале вклад орбитального момента незначителен, поскольку орбитали фиксированы в системе молекулярных связей сильными электростатическими взаимодействиями и вырождение по энергии между ними полностью снято.

Для определенности далее будем рассматривать частицы с чисто спиновым магнитным моментом ($J = S, L = 0$). При включении внешнего магнитного поля B_0 появляется выделенное направление, так что энергия E магнитного диполя в магнитном поле выражается через скалярное произведение магнитного диполя на проекцию магнитного момента на эту ось:

$$E = -(\mu, B_0) = g\beta B_0 m_J. \quad (6)$$

Согласно квантово-механическим правилам отбора возможны переходы, при которых значение магнитного квантового числа изменяется на величину $\Delta m_J = \pm 1$, тогда имеют место энергетические переходы электронов:

$$\Delta E = h\nu = g\beta B_0. \quad (7)$$

Магнитный резонанс можно истолковать с классических позиций. Согласно классическим представлениям заряженная частица, имеющая собственный механический момент (спин), при движении создает магнитное поле, т. е. характеризуется собственным магнитным моментом μ ; $\Delta E = h\nu = g\beta B_0$.

При помещении заряженной частицы в постоянное магнитное поле B_0 ее магнитный момент взаимодействует с полем с энергией взаимодействия $E = -(B, \mu)$. В результате такого взаимодействия частица получает вращательный момент, вызывая прецессию вектора вокруг B_0 под неизменным углом ϕ с частотой ν_0 . Такая прецессия создает переменный магнитный момент, вращающийся с частотой ν_0 перпендикулярно направлению поля B_0 . Если в той же плоскости в том же направлении вращается переменное магнитное поле B_1 с частотой ν_1 , то это поле взаимодействует с магнитным моментом. Взаимодействие тем больше, чем частота ν_1 ближе к ν_0 . При $\nu_1 = \nu_0$ наступает резонанс, сопровождающийся перекачкой (поглощением) энергии переменного магнитного поля B_1 в исходную систему.

Энергетические переходы между расщепленными в постоянном магнитном поле уровнями могут быть индуцированы электромагнитным излучением частоты. Для $g = 2$ (у электрона только спиновый момент) и $B_0 \sim 0,35$ Тл частота, на которой происходит поглощение, будет $\nu \sim 10$ ГГц. Большинство спектрометров ЭПР реализованы на частотах около 9 ГГц (X -диапазон) либо на частотах 36 ГГц (Q -диапазон). Индукция магнитного поля, соответствующая значению g -фактора для свободного электрона, на этих двух частотах будет равна соответственно 3300 и 13 000 Гс.

Теперь перейдем к системе, содержащей большое число парамагнитных частиц. Поведение парамагнетика в магнитном поле будет существенно зависеть от взаимодействия парамагнитных частиц друг с другом и с окружающими их диамагнитными частицами. Эти взаимодействия будут способствовать установлению термодинамического равновесия, если почему-либо оно окажется нарушенным. Поэтому в статическом магнитном поле B , если достигнуто равновесное состояние и допустимо использование законов распределения классической статистики, заселенности отдельных энергетических уровней N_1 и N_2 определяются больцмановским множителем:

$$N_2/N_1 = \exp(-\Delta E/(kT)), \quad (8)$$

где N_1 и N_2 – число частиц на каждом из подуровней: $N_2 + N_1 = N$.

При $T \sim 300$ °С и $B \sim 3000$ Гс будет выполняться $\Delta E/(kT) \ll 1$ ($\Delta E/(kT) \sim 10^{-3}$). Тогда при разложении в ряд получим

$$N_2/N_1 = 1 - \Delta E/(kT). \quad (9)$$

Заселенность нижних энергетических уровней больше, чем верхних, и поэтому при облучении электромагнитным СВЧ-излучением с энергией $\Delta E = h \cdot \nu$ количество индуцированных переходов с уровня с заселенностью N_1 на уровень с заселенностью N_2 будет больше, чем безызлучательных переходов с верхнего уровня на нижний.

Таким образом, в парамагнетике идут два разнонаправленных процесса: СВЧ-поле выравнивает заселенности различных магнитных уровней, а внутренние взаимодействия стремятся восстановить больцмановское распределение, переводя поглощенную энергию РЧ поля в тепло. В итоге установится динамическое равновесие заселенности энергетических уровней, СВЧ-энергия будет равномерно поглощаться образцом. Однако при повышении мощности СВЧ-излучения до предельного значения заселенности энергетических уровней в стационарном состоянии выравниваются, после чего увеличение поглощаемой энергии с ростом мощности СВЧ поля прекратится (наступит насыщение).

При тепловом равновесии заселенность нижнего спинового состояния электрона выше и преобладает поглощение энергии радиочастотного поля с переходом электронов в состояние с большей энергией. Заселенность уровней

может меняться в процессе эксперимента, но выравнивания заселенности и исчезновения сигнала поглощения не происходит из-за существования механизмов безызлучательного перехода электронов на нижний уровень, называемых релаксационными процессами. Энергия, полученная от радиоизлучения, может передаваться спиновой системе окружения, например в виде тепла, такой процесс называется спин-решеточной релаксацией и характеризуется временем T_1 .

Время жизни Δt верхнего состояния уменьшается также из-за индуцированного испускания, и при этом, как следует из принципа неопределенности $\Delta E \cdot \Delta t \approx \hbar$, возрастает неопределенность энергии состояния и происходит уширение линии.

Существует, кроме того, механизм спин-спиновой релаксации (характеризуемый временем T_2), определяемый беспорядочным распределением полей ядерных и электронных спинов вокруг неспаренного электрона, которое размывает его уровни энергии и также приводит к уширению линии. Таким образом, ширина линии определяется временем жизни возбужденного состояния: энергия уровня не фиксирована точно, неопределенность в энергии ΔE связана с неопределенностью во времени жизни Δt электрона на соответствующем энергетическом уровне соотношением неопределенностей $\Delta E \cdot \Delta t \approx \hbar$, при этом Δt определяется значениями T_1 и T_2 . Таким образом, значение ΔE будет тем больше, чем меньше времени Δt находится электрон в возбужденном состоянии, что приводит к уширению спектра; с другой стороны, очень большое время жизни вызывает сужение линий спектра, но требуется сравнительно небольшая мощность СВЧ-излучения для достижения эффекта насыщения.

Термин «спин-решеточная релаксация» возник потому, что в твердых телах избыточная энергия спиновой системы передается степеням свободы, связанным с колебаниями кристаллической решетки. В жидкостях энергия передается степеням свободы, связанным с вращениями и трансляциями внутри одной молекулы жидкости.

Одним из традиционных объектов исследования ЭПР-спектроскопии являются свободные радикалы – частицы, содержащие один или несколько неспаренных электронов. Частным случаем являются органические молекулы, содержащие единственный неспаренный электрон, – органические свободные радикалы (а также катион- и анион-радикалы).

Сверхтонкая структура (СТС) является одним из наиболее информативных параметров спектров ЭПР для подобных систем. Она определяется взаимодействием неспаренного электрона с магнитными ядрами, входящими в состав радикала, на которых есть спиновая плотность (так называемое сверхтонкое взаимодействие или СТВ). Методика описания поведения ядра в магнитном поле индукции B полностью аналогична описанию поведения электрона.

Компонента ядерного магнитного момента μ_N вдоль направления поля z (μ_z^N) описывается выражением

$$\mu_z^N = M_I \cdot g_N \cdot \beta_N, \quad (10)$$

где M_I – ядерное спиновое квантовое число (I – ядерный спин), M_I может принимать $(2I + 1)$ значений от $-I \dots$ до $+I$ через 1; g_N – ядерный g -фактор, безразмерная величина, характеризующая ядро.

Величина ядерного магнетона β_N в 1836 раз меньше магнетона Бора β электрона в соответствии с соотношением масс протона и электрона.

В качестве примера рассмотрим появление СТВ при взаимодействии неспаренного электрона с ядром азота, у которого есть магнитный момент. Это взаимодействие наблюдается в молекуле нитроксильного радикала NO. Нитроксильный радикал в качестве метки широко используется для исследования различных систем. На неспаренный электрон, локализованный на ядре азота, кроме внешнего поля B_0 действует магнитное поле, которое создается магнитным моментом μ_N ядра азота. Ядро азота имеет спин $I = 1$, поэтому возможны три проекции магнитного момента μ_N : по направлению, перпендикулярно и против внешнего магнитного поля B_0 .

Этим ориентациям ядерного спина соответствуют значения магнитного квантового числа: $m_I = -1, 0, 1$. Таким образом, каждый из двух уровней энергии, расщепленных из-за эффекта Зеемана, расходуется, в свою очередь, на три подуровня.

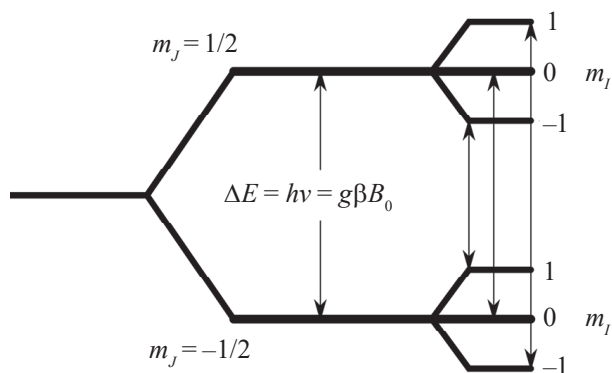


Рис. 1. Схема энергетических уровней парамагнитной молекулы NO

Энергетические переходы, индуцированные СВЧ-излучением, отбираются в соответствии с квантово-механическими правилами, – у электрона ориентация спина изменяется: $\Delta m_J = \pm 1$, а ориентация спина ядра атома сохраняется: $\Delta m_I = 0$. Поэтому результатом СТВ является наличие трех линий с одинаковой постоянной в спектре NO радикала, которые соответствуют ориентациям магнитного момента ядра азота (рис. 1). Для атома со спином ядра $I = 1$ таких ком-

понт будет $2I + 1 = 3$. В результате вместо одной линии поглощения получается $2I + 1$ линий. Энергия соответствующих уровней записывается в виде

$$E = g\beta \cdot B_0 \cdot m_s + h \cdot m_l \cdot a_{\text{св}},$$

где $a_{\text{св}}$ – константа изотропного СВ. Во многих ориентированных системах наряду с анизотропией g -фактора встречается и анизотропия сверхтонкого расщепления.

При СВ с протоном, ядро которого имеет спин $I = 1/2$, проявляются две спектральные линии с одинаковыми интенсивностями.

Спектрограммы также могут быть составлены для радикалов, содержащих более одного магнитного ядра, путем последовательного расщепления уровней E_1 и E_2 в соответствии с взаимодействиями с рассматриваемыми ядрами. В случае нескольких эквивалентных ядер возникают сверхтонкие структуры.

В общем случае n эквивалентных ядер со спиновым квантовым числом I дают $(2nI + 1)$ эквидистантных сверхтонких линий. Для $I = 1/2$ соотношение интенсивностей линий расщепления представляет собой треугольник Паскаля.

Эффект поглощения СВЧ-излучения при переходе между зеемановскими уровнями энергии парамагнитных электронов в постоянном магнитном поле лежит в основе работы ЭПР-спектрометра.

Устройство и принцип работы ЭПР-спектрометра. Как было показано выше, условие парамагнитного резонанса описывается уравнением $h\nu = g\beta B$. Для его наблюдения можно применить два подхода – изменение частоты электромагнитного излучения при постоянном магнитном поле или изменение индукции поля при постоянной частоте. Поскольку изменять индукцию магнитного поля в широких пределах на практике значительно легче, чем частоту электромагнитного излучения, в спектрометрах ЭПР используется второй метод, и спектр ЭПР представляет собой зависимость поглощения электромагнитной энергии от величины магнитного поля. В этом случае спектрометр ЭПР можно представить в виде схемы (рис. 2) [2].

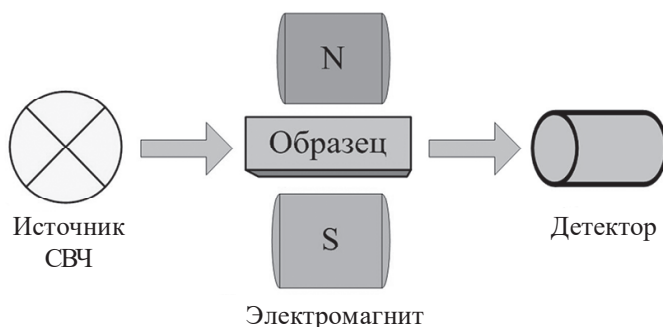


Рис. 2. Блок-схема спектрометра ЭПР

Однако подобная схема основана на регистрации сигнала пропускания, в современных же приборах используется другая схема регистрации ЭПР, это связано с тем, что сигналы ЭПР имеют низкую интенсивность. Схема прибора «ELEXSYS E500» представлена на рис. 3.

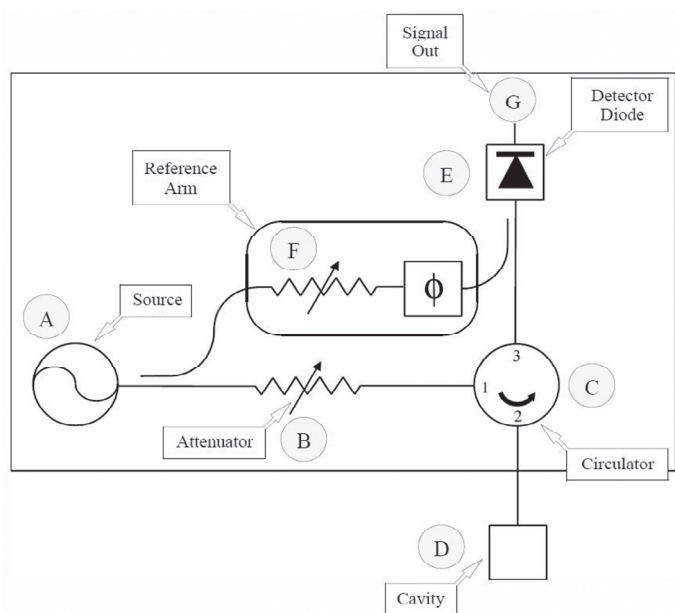


Рис. 3. Схема спектрометра ЭПР

Электромагнитное излучение от источника А проходит через аттенюатор В, предназначенный для регулировки мощности СВЧ, затем через циркулятор С (циркулятор – устройство для направленной передачи энергии СВЧ-излучения, канализирует электромагнитные колебания в соответствующие интерфейсы) и через волновод попадает на резонатор с образцом D. Отраженное от резонатора излучение через циркулятор подается на детектор Е, сигнал с которого поступает на усилитель G с переменным коэффициентом усиления и далее на регистрирующее устройство. Циркулятор необходим для разделения потоков излучения от источника и от резонатора. Таким образом, на детектор попадает только отраженное излучение и не попадает излучение от источника.

Усилитель предназначен для согласования уровня сигнала с выхода детектора с уровнем входного сигнала регистрирующего устройства. Детектор преобразует мощность СВЧ-излучения в электрический ток, при этом зависимость тока от мощности излучения довольно сложная. При достаточно низкой мощности она носит квадратичный характер, при более высокой мощности – линейный. Дальнейшее повышение мощности приводит к выходу детектора из строя.

Чтобы детектор все время работал в линейной области, в схему введена цепь опорного сигнала F . Излучение от источника, проходя через нее, ослабляется аттенуатором до необходимой величины, проходит через фазовращатель и суммируется с отраженным от образца сигналом.

В результате измерения спектрометр регистрирует спектральные линии ЭПР.

Основные характеристики спектров ЭПР. Спектры ЭПР записывают производную линии спектра поглощения СВЧ-излучения. Поэтому для изучения записанных спектров необходимо пользоваться правилами работы с производными функции. В ЭПР-спектроскопии принята несколько иная, отличная от общепринятой терминология для обозначения параметров линий. Основные параметры спектров ЭПР – интенсивность, форма и ширина резонансной линии, g -фактор, константы тонкой и сверхтонкой структуры.

Линия – отражает вероятность процесса резонансного поглощения электромагнитного излучения парамагнитными центрами и определяется процессами, в которых участвуют спины.

Форма линии – отражает закон распределения вероятности резонансных переходов; имеет гауссову форму для образцов, у которых основным релаксационным процессом является спин-решетчатый. Наличие дополнительно обменных спин-спиновых взаимодействий приводит к лоренцевой форме линии. В общем случае форма линии описывается смешанным законом (рис. 4).

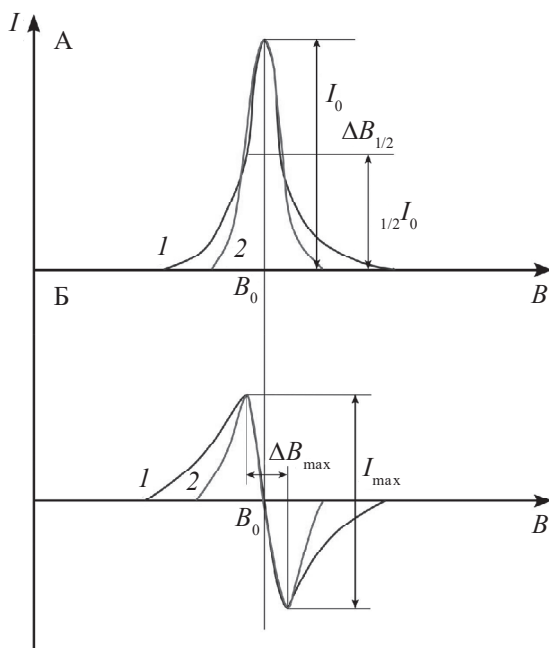


Рис. 4. Линия ЭПР поглощения (А) и ее первая производная (Б):
 1 – гауссова форма; 2 – лоренцева форма

Ширина линии (ΔB_{\max}) – расстояние по оси индукции поля между экстремумами на кривой линии.

Амплитуда линии (I_{\max}) – соответствует по шкале амплитуды сигнала расстоянию между экстремумами на кривой линии.

Интенсивность (I_0) – значение вероятности поглощения СВЧ-излучения в точке максимума на кривой поглощения, вычисляемой при интегрировании зарегистрированной спектрограммы.

Интегральная интенсивность – площадь под кривой поглощения, пропорциональна количеству парамагнитных центров в образце и вычисляется путем двойного интегрирования зарегистрированной спектрограммы.

Положение линии (величина B_0 в точке максимума) – соответствует пересечению контура производной dI/dB с нулевой линией.

g-Фактор является параметром, определяющим положение линии резонансного поглощения в спектре ЭПР; также принято рассматривать спектроскопический фактор расщепления Ланде или *g-фактор*. Величина *g-фактора* – индивидуальное свойство каждого вещества. Угол расхождения энергетических уровней при увеличении магнитных полей зависит от *g-фактора*, и для различных веществ он разный. С другой стороны, *g-фактор* зависит от структуры атома, свойств его ядра и его химического окружения, что позволяет исследовать строение молекул вещества.

2. ОСНОВЫ РАБОТЫ С ПРОГРАММНО-АППАРАТНЫМ КОМПЛЕКСОМ «ELEXSYS E500»

Процесс регистрации ЭПР-сигналов в исследуемых образцах выполняется с использованием ЭПР-спектрометра «ELEXSYS E500» в комплексе с ПО «Хепр» (Bruker, Германия).

На рис. 5 представлен программно-аппаратный комплекс «ELEXSYS E500» [3]. Источник электромагнитного излучения и детектор находятся в ящике под названием «СВЧ-мост», образец – в микроволновом резонаторе, который представляет собой металлический ящик, помогающий усиливать слабые сигналы от образца. Имеется магнит для «настройки» электронных уровней энергии. Кроме того, есть консоль, которая содержит систему обработки сигналов и управления. Существует компьютер, используемый для анализа данных, а также для координации всех блоков для получения спектра. Ниже будет описано, как эти различные части спектрометра функционируют и взаимодействуют.

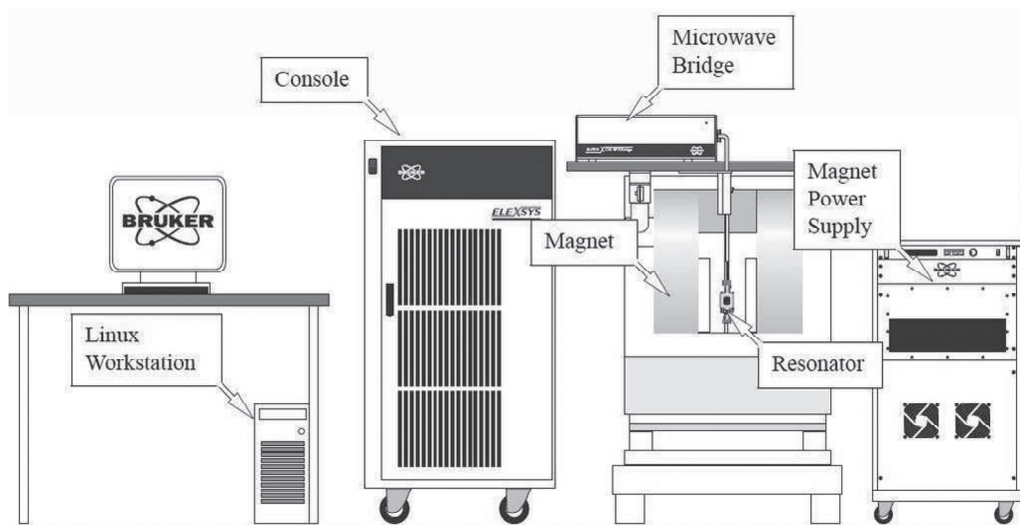


Рис. 5. Программно-аппаратный комплекс «ELEXSYS E500»
(Bruker, Германия)

1. Подготовка программно-аппаратного комплекса «ELEXSYS E500» к работе

- 1.1. Включить водяное охлаждение.
- 1.2. Включить питание системы.

Тумблер питания, расположенный на стене, установить в верхнем положении.

1.3. Запустить программу Херг.

Дважды щелкнуть значок Херг на рабочем столе компьютера для запуска программы.

1.4. Включить теплообменник и блок питания электромагнита.

Сначала установить тумблер замыкания цепи в верхнем положении на задней стенке блока для подачи напряжения на теплообменник, затем включить охладитель путем нажатия кнопки включения питания (на корпусе) (рис. 6).

1.5. Включить питание контроллера.

Кнопка включения питания (зеленая) расположена в верхнем левом углу лицевой части контроллера (рис. 7). Сервер будет загружать и инициализировать все модули из спектрометра «ELEXSYS E500». Этот процесс может занять 30 с и более.

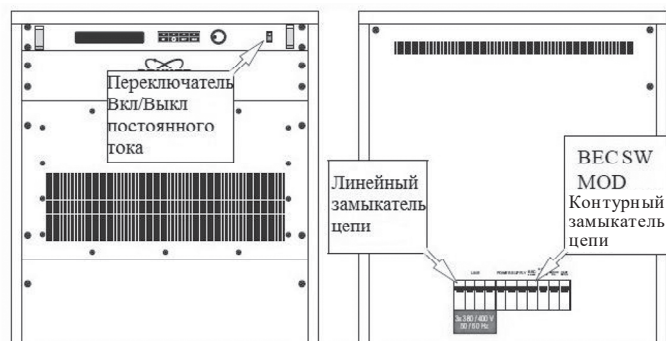


Рис. 6. Переключатели блока питания электромагнита

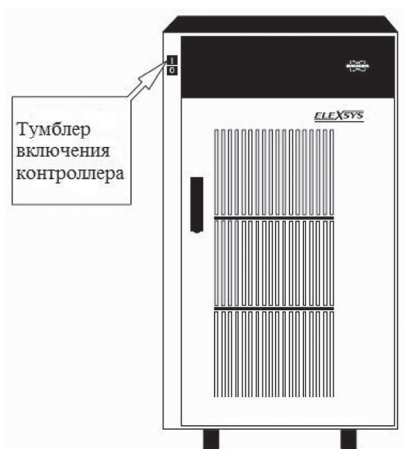


Рис. 7. Расположение выключателя питания на контроллере

Убедиться, что спектрометр перешел в рабочий режим по постоянному свечению индикатора на передней панели микроволнового генератора (рис. 8).

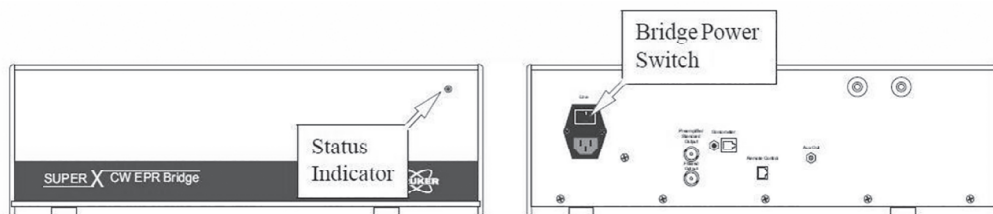


Рис. 8. Передняя и задняя панели микроволнового генератора «CW-EPR-Bridge»

1.6. Подключиться к спектрометру.

Для управления спектрометром из программы Херг подключить к нему рабочую станцию. Для этого в диалоговом окне программы Херг нажать на Acquisition и в выпавшем меню кликнуть на строку Connect To Spectrometer. Появится окно с именем сервера: localhost. Нажать кнопку ОК (рис. 9).

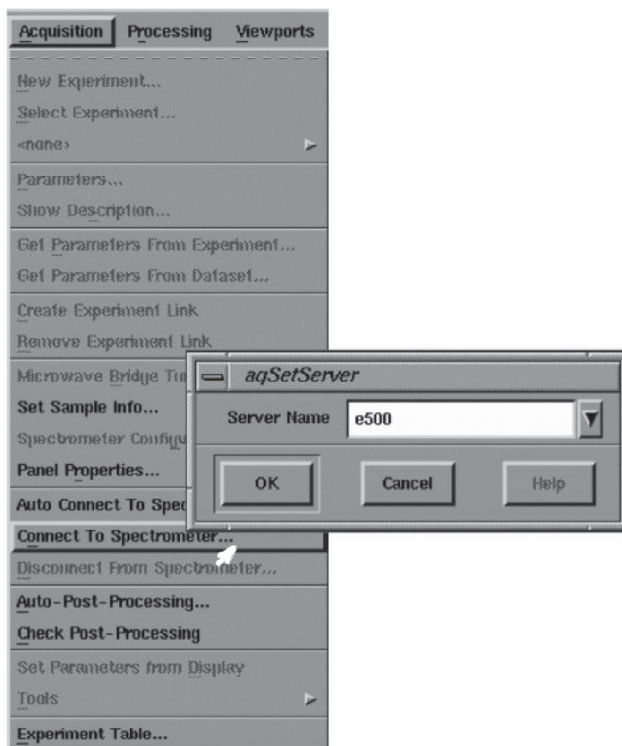


Рис. 9. Соединение со спектрометром

Когда соединение завершится, в окне Херг появится панель управления спектрометром (рис. 10).

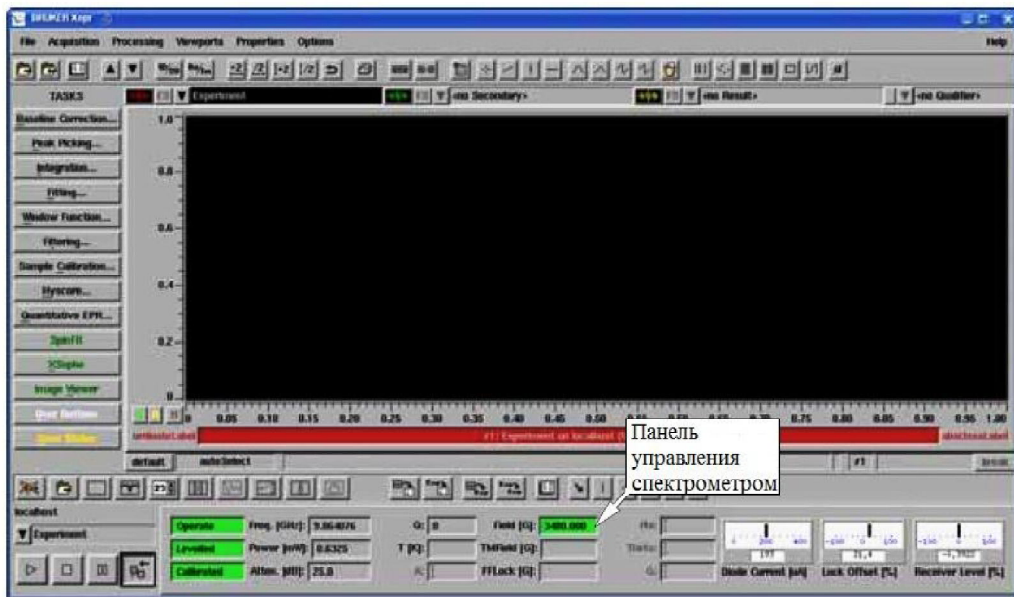


Рис. 10. Диалоговое окно программы Херг

2. Подготовка исследуемого раствора к регистрации ЭПР-спектров

2.1. Поместить ампулу с исследуемым раствором в резонатор ЭПР-спектрометра таким образом, чтобы уровень исследуемой жидкости находился в центральной части резонатора (рис. 11).

Установка ампулы с образцом в корпус резонатора показана на рис. 12.

2.2. Открыть диалоговое окно настройки генератора СВЧ.

На панели управления спектрометром нажать Tuning Button. Появится диалоговое окно Microwave Bridge Tuning (рис. 13).

2.3. Нажать кнопку Tune для активизации режима настройки микроволнового генератора.

2.4. Установить мощность генератора на 30 дБ.

Мощность устанавливается нажатием на стрелки по обе стороны от дисплея мощности в диалоговом окне (рис. 13). Стрелки слева изменяют мощность с шагом 10 дБ, справа – с шагом 1 дБ.

2.5. Настроить генератор и резонатор.

При нажатии любой кнопки Up или Down из AutoTune запускается процедура автоматической настройки (рис. 13). Частота сканируется до поиска максимума, затем идет сканирование в другом направлении до тех пор, пока не будет найден провал. Процедура AutoTune настраивает частоту, фазу, смещение генератора и волновод резонатора.

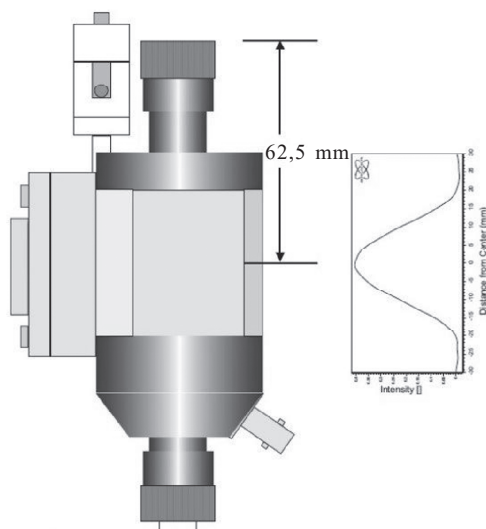


Рис. 11. Распределение интенсивности сигнала в резонаторе ER4122SHQE.
Расстояние от верхнего зажима до центра резонатора 62,5 мм,
активная длина 40 мм

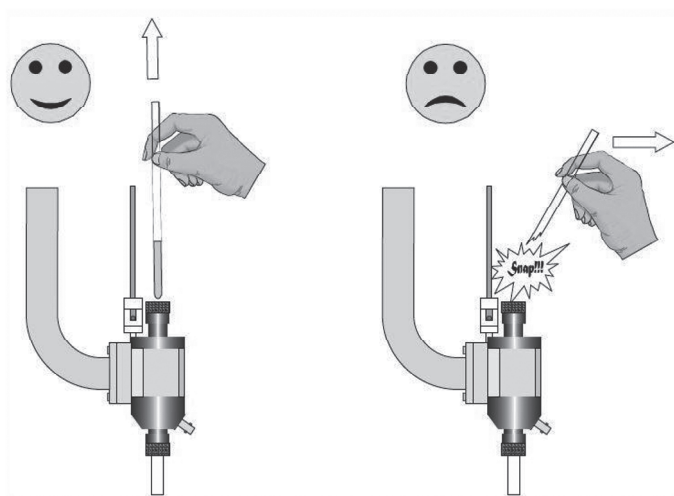


Рис. 12. Примеры правильной (слева) и неправильной (справа)
установки ампулы с образцом в корпус резонатора

2.6. Закрывать диалоговое окно настройки микроволнового генератора нажатием на кнопку Close (рис. 13).

2.7. Создать новый эксперимент.

Для получения спектра необходимо создать новый эксперимент. Нажать кнопку New Experiment на панели управления спектрометром. На вкладке C.W. для Abscissa 1 выбрать Field, а для Abscissa 2 – None, на оси ординат – Signal Processing Unit. Нажать кнопку Create, после чего диалоговое окно закроется.

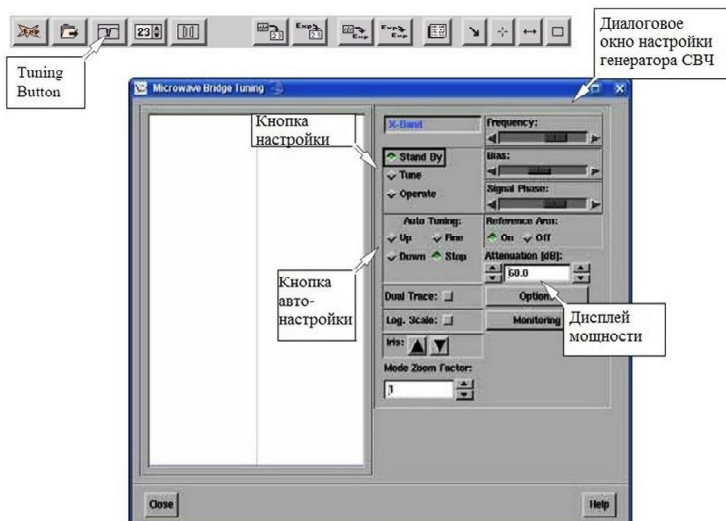


Рис. 13. Диалоговое окно настройки микроволнового генератора

2.8. Задать параметры эксперимента.

На панели управления спектрометром нажать на кнопку Parameter Button и ввести параметры, подходящие для исследуемой системы.

3. Регистрация ЭПР-спектров исследуемого образца

Начать регистрацию ЭПР-спектров анализируемого образца нажатием на кнопку Run на панели управления спектрометром (рис. 14).

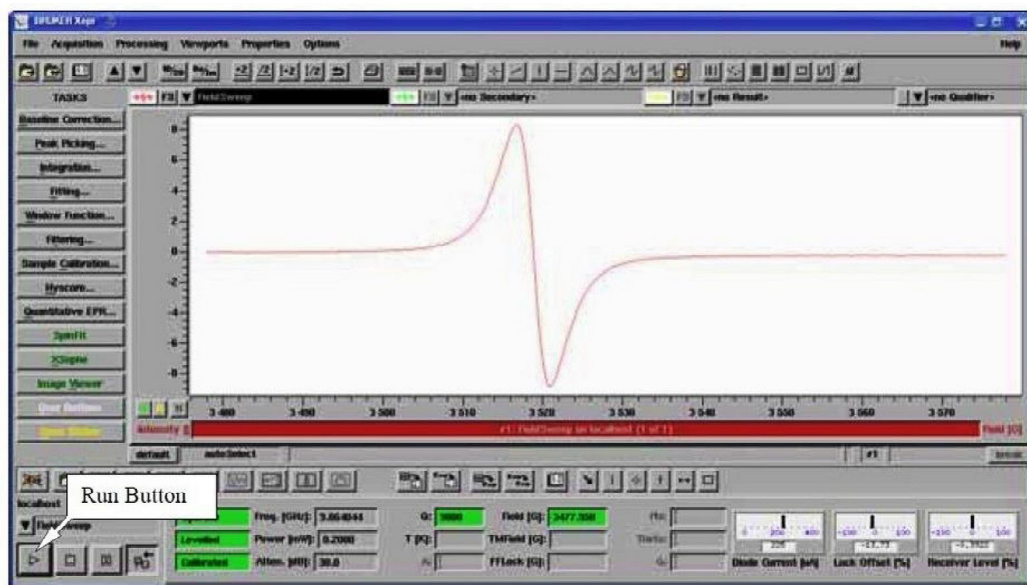


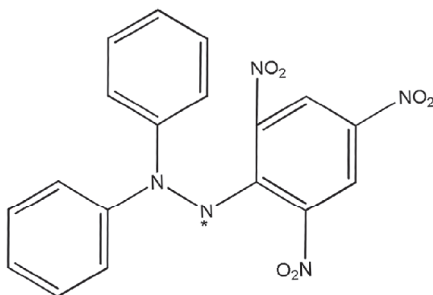
Рис. 14. Пример зарегистрированного ЭПР-спектра

Лабораторная работа 1

ОПРЕДЕЛЕНИЕ АНТИРАДИКАЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ ИНДИВИДУАЛЬНЫХ АНТИОКСИДАНТОВ МЕТОДОМ ЭПР-СПЕКТРОСКОПИИ

Цель работы – освоение методики определения антирадикальной активности (АРА) индивидуальных антиоксидантов (АО) и смеси веществ на основе ДФПГ-анализа на ЭПР-спектрометре.

Сущность метода определения



ДФПГ – 2,2-дифенил-1-пикрилгидразил, брутто-формула $C_{18}H_{12}N_5O_6$, молярная масса 394 г/моль. Один из электронов центрального атома азота остается неспаренным, резонансное поглощение наблюдается именно на этом электроне.

К достоинствам ДФПГ-анализа относятся высокая воспроизводимость, простота выполняемых операций, общедоступность необходимого оборудования, высокая чувствительность, высокая селективность по отношению к антирадикальным АО.

Спиртовой раствор ДФПГ имеет длительный стабильный сигнал в виде ЭПР-спектра, из которого можно рассчитать количество парамагнитных частиц. Число парамагнитных частиц свободного радикала ДФПГ снижается после добавления вещества, обладающего АРА в результате протекания химических реакций в соответствии с концентрацией и количеством функциональных групп:

1. $nDPPH\cdot + mAr-OH \rightarrow Ar-O\cdot + DPPH-H$.
2. $Ar-O\cdot + DPPH\cdot \rightarrow \text{product}$.
3. $Ar-O\cdot + Ar-O\cdot \rightarrow \text{product}$.

Определение АРА проводят по разности количеств парамагнитных частиц стабильного свободного радикала, измеряемых до и после полного прохождения химической реакции между свободным радикалом и анализируемым веществом. По мере добавления анализируемого вещества происходит снижение интенсивности ЭПР-спектра свободного радикала.

Объект анализа – индивидуальные антиоксиданты.

Реактивы:

- 2,2-дифенил-1-пикрилгидразил (Sigma);
- спирт этиловый 95 %;
- кислота аскорбиновая 99 % (Panreac);
- *L*-цистеин гидрохлорид 99 % (Panreac);
- пирокатехин 99 % (Sigma);
- вода деионизированная.

Выполнение анализа

1. Параметры ЭПР-спектрометра для анализа этанолового раствора ДФПГ

Мощность – 20 дБ; поле 3478–3518 Гс; *g*-фактор – 2,007; амплитуда модуляции – 1 Гс; время преобразования одной точки – 40 мс.

2. Приготовление анализируемых растворов

Точную навеску ДФПГ (0,0039 г) помещают в пробирку вместимостью 15 см³. Затем добавляют 10 см³ этилового спирта и перемешивают до полного растворения ДФПГ. Приготовленный раствор ДФПГ выдерживают в течение 30 мин при комнатной температуре.

Навески индивидуальных АО рассчитывают таким образом, чтобы концентрация в 1 см³ составляла 10 мМ. Полученные навески АО помещают в отдельные пробирки (Eppendorf) вместимостью 1 см³.

Аскорбиновую кислоту растворяют в 1 см³ этилового спирта, *L*-цистеин и пирокатехин (концентрацией 10 мМ) растворяют в 1 см³ деионизированной воды.

3. Получение ЭПР-спектров до и после взаимодействия с индивидуальным АО

Приготовленный раствор ДФПГ заданной концентрации отбирают в особый стеклянный капилляр вместимостью 50 мкл и запечатывают его специальной пастой. Капилляр помещают в кварцевую ячейку, которую затем устанавливают в резонатор спектрометра. Регистрируют ЭПР-спектры, проводят математическую обработку полученного спектра и получают значения молярной концентрации и количества парамагнитных частиц ДФПГ в приготовленном растворе, как это описано в п. 3 параграфа 2 (с. 20).

Далее отбирают три аликвоты по 1 см³ раствора ДФПГ. К каждой аликвоте приливают по 0,01 см³ анализируемого АО, тщательно перемешивают

и засекают время. Одну параллель помещают в резонатор ЭПР-спектрометра для регистрации спектров в течение 20 мин каждые 2 мин в соответствии с п. 1–3 параграфа 2 (с. 15–20) данного пособия. ЭПР-спектры оставшихся двух параллелей регистрируют по истечении 20 мин с момента приготовления (рис. 15). Затем проводят математическую обработку полученных спектров и получают значения молярной концентрации и количества парамагнитных частиц ДФПГ после реакции с анализируемым АО.

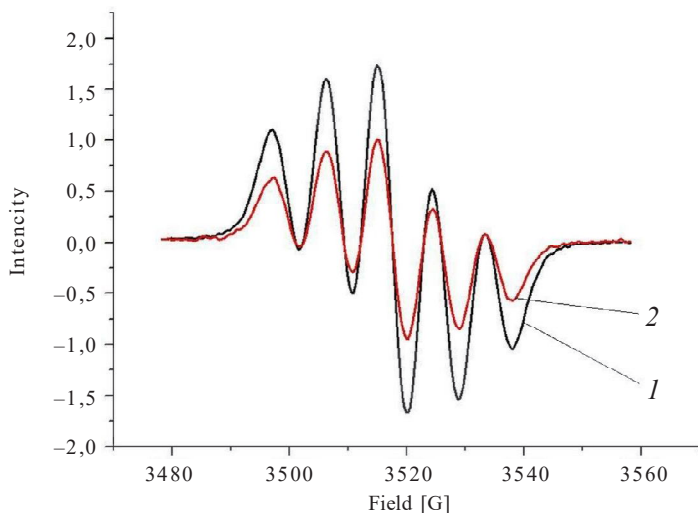


Рис. 15. Зависимость поглощаемой мощности переменного поля от напряженности внешнего магнитного поля. ЭПР-спектры ДФПГ до взаимодействия (1) и после взаимодействия с АО (2)

4. Определение АРА анализируемых АО

Значение АРА рассчитывается по формуле

$$ARA = \frac{(n_{S_1} - n_{S_2}) \cdot C_{DPPH}}{n_{S_1}}, \quad (11)$$

где АРА – антирадикальная активность, М-экв; C_{DPPH} – концентрация стабильного радикала ДФПГ в исходном растворе, М; n_{S_1} – начальное количество парамагнитных частиц ДФПГ; n_{S_2} – количество парамагнитных частиц ДФПГ после взаимодействия с исследуемым веществом.

Результат анализа вычисляют как среднее арифметическое трех проведенных экспериментов.

5. Выводы

На основе полученных значений АРА делают выводы о механизмах взаимодействия антиоксидантов с радикалами. По итогам работы предоставляется отчет.

3. ТЕОРЕТИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ МЕТОДА ВОЛЬТАМПЕРОМЕТРИИ

Для медицинской диагностики, контроля качества лекарственного средства и проведения анализов на этапе его создания разработано множество методов. Стандартными методами определения органических веществ в фармпрепаратах, как правило, являются спектрофотометрические и хроматографические, включая методы высокоэффективной жидкостной хроматографии. Однако, несмотря на их бесспорное лидерство, в последние годы для определения органических веществ и неорганических элементов в медицинской диагностике все чаще используют электрохимические методы анализа. Это обусловлено их многообразием, высокой чувствительностью, точностью результатов, быстротой проведения анализа и возможностью автоматизации.

Электрохимические методы анализа – это методы качественного и количественного анализа веществ, находящихся в газообразном, жидком (в растворах и расплавах) или твердом состоянии, основанные на электрохимических явлениях в исследуемой среде или на границе соприкасающихся фаз и связанные с изменением структуры, химического состава или концентрации.

Любые вещества, в которых наблюдаются окислительно-восстановительные свойства, можно исследовать с помощью электрохимических методов, потому что из них можно получить информацию о переносе электрона, участвующего в электрохимическом превращении, концентрации определяемого компонента, а также кинетические параметры.

Вольтамперометрия объединяет методы исследования зависимости тока от напряжения поляризации, накладываемого на исследуемую ячейку, когда рабочий электрод имеет потенциал, значительно отличающийся от его равновесного значения (рис. 16).

Вольтамперометрия – это группа методов, основанных на получении и расшифровке вольтамперных зависимостей межфазной границы «поляризующийся электрод – раствор электролита», в которых могут содержаться определяемые вещества, имеющие, как правило, электроактивные свойства.

Вольтамперометрическая ячейка в простейшем случае состоит из индикаторного (рабочего) электрода и во много раз превышающего его площадь вспомогательного электрода, погруженных в токопроводящий раствор – электролит. При этом плотность тока на вспомогательном электроде пренебрежимо мала по сравнению с рабочим электродом, поэтому потенциал вспомогательного электрода можно считать постоянным. Для уменьшения сопро-

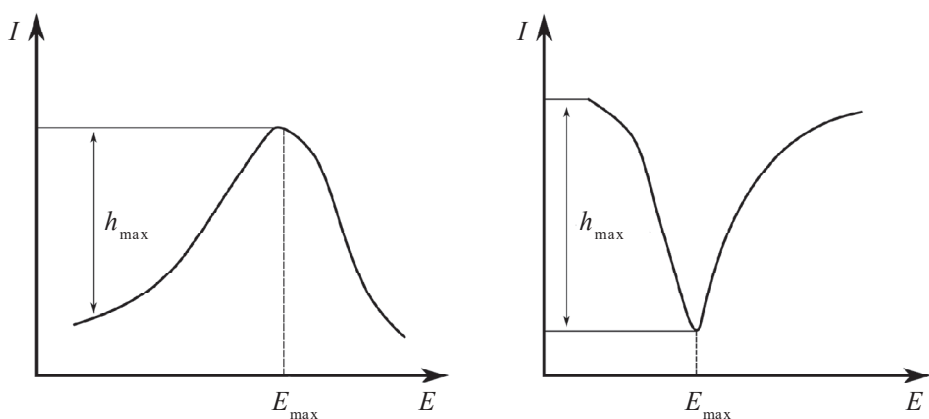


Рис. 16. Вид регистрируемой зависимости при вольтамперометрическом исследовании

тивления раствора в него добавляют индифферентный (фоновый) электролит. В данном случае напряжение между внешними концами электродов практически равно разности их потенциалов или, иначе говоря, потенциалу рабочего электрода, измеренного относительно постоянного потенциала второго электрода.

Следовательно, регистрируемое напряжение между электродами и ток во внешней цепи отображают электродные процессы на поверхности рабочего электрода. В то же время благодаря малому падению напряжения перенос электроактивного вещества в растворе в основном происходит за счет диффузии.

Наличие электроактивных частиц воспроизводится на регистрируемой вольтамперограмме в виде характерных ступеней (волн) или пиков. Вид кривой зависит от способа ее получения. При этом потенциал полуволны $E_{1/2}$ является уникальным показателем, позволяющим определить искомые вещества, а высота тока пика несет информацию об их концентрации в растворе и, косвенно, о количестве электронов, участвующих в электропревращении.

В вольтамперометрии существует два вида электрического воздействия на систему, используются 1) заданный потенциал индикаторного электрода, изменяющийся во времени по некоторому закону $E(t)$; 2) заданный ток $I(t)$. В первом случае аналитическим сигналом является ток, во втором – электродный потенциал. В соответствии с этим аппаратные методы вольтамперометрии могут быть либо с контролируемым потенциалом – потенциостатические методы (хроноамперометрия), либо с контролируемым током – гальваностатические методы (хронопотенциометрия).

Хроноамперометрия – это метод исследования и анализа, основанный на изучении зависимости от времени величины тока, протекающего через электролитическую ячейку при определенном значении электродного потенциала

поляризуемого электрода. Неперемешиваемый раствор содержит в достаточно большой концентрации индифферентный (фоновый) электролит, так что ионы достигают электрода лишь за счет диффузии. Получающаяся кривая показана на рис. 17.

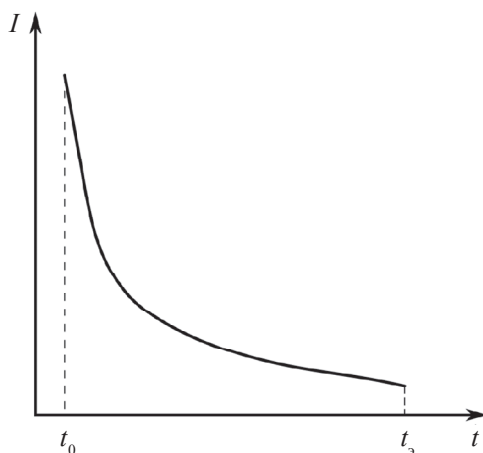


Рис. 17. Хроноамперометрическая зависимость

Простейшей физико-химической моделью, описывающей происходящие в данном случае процессы, является модель убывающего во времени диффузионного тока при постоянном потенциале. Согласно этой модели зависимость величины тока от времени подчиняется уравнению Коттрелла (12):

$$I = nFAC_0\sqrt{D/\pi t}, \quad (12)$$

где n – количество электронов, участвующих в элементарном акте окисления/восстановления; F – постоянная Фарадея 96 485 К/моль; A – площадь рабочей поверхности электрода (см^2); C_0 – начальная концентрация электроактивного вещества ($\text{моль}/\text{см}^2$); D – коэффициент диффузии ($\text{см}^2/\text{с}$); t – время (с).

Так как при изучении окислительно-восстановительных механизмов новых препаратов и веществ зачастую неизвестны коэффициент диффузии и количество электронов, то совмещают два или более способов определения данных параметров. Одним из самых простых в применении способов является метод сравнения количества электричества с количеством электричества модельной системы, основанный на законе Фарадея (13):

$$\Delta m = \frac{Q \cdot M}{F \cdot n}, \quad (13)$$

где Δm – масса вещества, подвергшегося электропревращениям (г); Q – количество электричества, затраченное на перенос электронов и равное площади

под хроноамперометрической кривой (рис. 18) (Кл); F – постоянная Фарадея 96 485 (Кл/моль); M – молярная масса вещества (г/моль); n – количество электронов, участвующих в окислении/восстановлении.

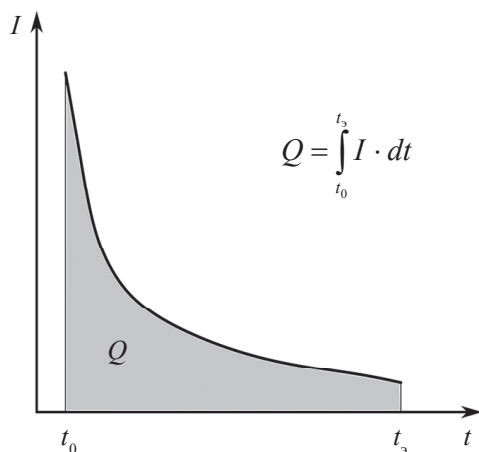


Рис. 18. Определение количества электричества на хроноамперометрической кривой

Используя закон Фарадея, выразим (13) для нахождения количества электронов:

$$n = \frac{Q \cdot M}{F \cdot \Delta m}; \quad (14)$$

примем $z = \frac{\Delta m}{M}$ (14), z не что иное, как количество вещества (моль); подставив (14) в (13), получим

$$n = \frac{Q}{z \cdot F}. \quad (15)$$

Так как концентрация исследуемого и сравнительного вещества берется одинаковой, а число Фарадея является общим для всех, то для определения количества электронов исследуемого вещества можно использовать следующее соотношение:

$$n_1 = \frac{n_2 \cdot Q_1}{Q_2}, \quad (16)$$

где n_1 – количество электронов искомого вещества; n_2 – количество электронов известной системы; Q_1 – количество электричества, затраченное исследуемым веществом (Кл); Q_2 – количество электричества, затраченное известной системой (Кл).

Лабораторная работа 2

**ОПРЕДЕЛЕНИЕ КОЛИЧЕСТВА ЭЛЕКТРОНОВ,
УЧАСТВУЮЩИХ В ПРОЦЕССЕ ВОССТАНОВЛЕНИЯ
ПРЕПАРАТА ТРИАЗАВИРИН®,
С ПОМОЩЬЮ ЭЛЕКТРОХИМИЧЕСКИХ МЕТОДОВ**

В современной научной медицинской практике существует большое количество лекарственных препаратов, содержащих нитрогруппу, которые проявляют активность против вируса гриппа. Одной из них является синтезированная на кафедре органической и биомолекулярной химии ХТИ УрФУ натриевая соль 2-метилтио-6-нитро-1,2,4-триазоло[5,1-с]-1,2,4-триазин-7-она дигидрата (Триазавирин®) (рис. 19). Авторами показано, что высокая противовирусная активность препаратов может быть связана с окислительно-восстановительными превращениями нитрогруппы. В соответствии со структурой данного вещества для него характерны окислительно-восстановительные превращения, что позволяет проводить исследования с использованием электрохимических методов (ЭХ).

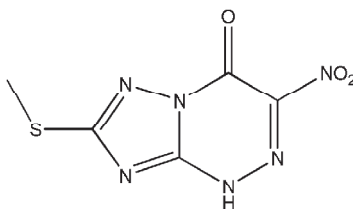


Рис. 19. Структурная формула препарата Триазавирин®

Цель работы – рассчитать количество электронов, участвующих в окислительно-восстановительных реакциях у лекарственных веществ, с помощью вольтамперометрического метода исследования на примере препарата Триазавирин® и аскорбиновой кислоты (рис. 20) с использованием модельной системы ферроцианида (III) калия.

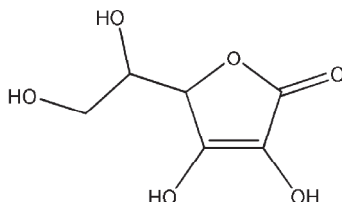


Рис. 20. Структурная формула аскорбиновой кислоты

Объекты анализа: $5 \cdot 10^{-3}$ М растворы исследуемых веществ: аскорбиновая кислота ($M = 176$ г/моль), препарат Триазавирин® (286,19 г/моль).

Реактивы:

1) гексацианоферрат калия (III ($K_3[Fe(CN)_6]$)) ($M = 329$ г/моль) по ГОСТ 4207-75, ч.д.а;

2) кислота аскорбиновая 99 % (Panreac);

3) субстанция препарата Триазавирин®;

4) буферный раствор Бриттона–Робинсона рН = 1,8–2,1;

5) вода дистиллированная.

Аппаратура. Измерения выполняют с использованием потенциостата/гальваностата μ Autolab Type III на стандартной трехэлектродной ячейке. Рабочим электродом служит стеклоглеродный электрод (диаметр 3 мм). В качестве вспомогательного электрода используют стержень из стеклоглерода. Электродом сравнения служит хлоридсеребряный электрод. Измерения рН проводятся на ионометре «Эксперт-рН». Перемешивание раствора осуществляется с помощью магнитной мешалки ПЭ-6100. Для продувки растворов используется инертный газ аргон чистотой 99,99 %.

Подготовка к анализу

Навески исследуемых веществ и гексацианоферрата калия, исходя из их концентраций, взвешивают на аналитических весах с точностью до четвертого знака после запятой.

Перед началом работы *электрохимическую ячейку* тщательно промывают дистиллированной водой, затем помещают 1М раствор щелочи, выстаивают 5–10 мин. После этого тщательно промывают дистиллированной водой и сушат на фильтровальной бумаге при комнатной температуре. ***Данную процедуру необходимо производить перед каждой сменой раствора вещества.***

Электродом сравнения служит одноключевой хлоридсеребряный электрод. По мере вытекания следует заполнять электрод новой порцией электролита (раствора хлорида калия) с помощью полиэтиленовой пипетки. Для этого поднимают шлиф и дают электролиту немного стечь, затем опускают шлиф и снова заполняют электрод до отверстия для заполнения. ***Не применяйте стеклянные пипетки для перезаполнения электрода во избежание повреждения последнего.*** Необходимо следить за отсутствием воздушных пузырьков в электроде. Если они появились, необходимо осторожно постучать по электроду, удерживая его в вертикальном положении, пока все пузырьки не выйдут из электролита. Также необходимо следить, чтобы уровень электролита в электроде сравнения всегда превышал уровень жидкости в стакане для титрования.

Очистка электрода производится следующим образом. Промывают электрод сравнения проточной водой в течение не менее 3 мин, затем вытирают фильтровальной бумагой. Если электроды сильно загрязнены, то их промывают 0,1М соляной кислотой и затем чистой водой. ***Будьте внимательны: попадание между стеклянными контактирующими частями электрода сравнения посторонних частиц может привести к возникновению аномальных потенциалов.*** В этом случае контактирующие части следует промыть водой. После завершения процедуры очистки электродов их промывают дистиллированной водой и высушивают фильтровальной бумагой.

В рабочем состоянии заливное отверстие должно быть открыто, чтобы обеспечивался свободный проток электролита через жидкостный контакт. Закрывать заливное отверстие пробкой допускается только для хранения электрода. Храните электрод заполненным электролитом и с надетой на жидкостный контакт насадкой, поставляемой в комплекте с электродом.

Вспомогательный электрод тщательно промывают дистиллированной водой и насухо вытирают фильтровальной бумагой. Поверхность рабочего электрода механически чистят с использованием пасты Al_2O_3 на тканевой подложке. Затем тщательно промывают дистиллированной водой и полируют на фильтровальной бумаге. ***Чистка рабочего электрода проводится перед каждым новым измерением, чистка всех электродов производится перед каждой сменой раствора вещества. Предварительно следует убедиться, что ячейка выключена и на электроды не подается напряжение.***

Измеряют рН готового раствор Бриттона–Робинсона. Если рН не соответствует 1,8–2,1, то доводят до необходимого значения гидроксидом натрия или ортофосфорной кислотой. ***Температура раствора в момент доведения до необходимого рН и в момент проведения исследований должна быть 25 °С. В противном случае делается поправка на температурный коэффициент.***

Электроды погружают в исследуемый раствор и подключают с помощью клемм к прибору:

WE (work electrode) – рабочий электрод (красная клемма);

RE (reference electrode) – электрод сравнения (синяя клемма);

CE (counter) – противоэлектрод (вспомогательный) (черная клемма);

\equiv – заземление (зеленая клемма). ***Важно, чтобы данная клемма не соприкасалась с металлическими частями прибора во избежание замыкания.***

В электрохимическую ячейку помещают 20 мл раствора буфера Бриттона–Робинсона с рН = 1,8–2,1. Затем добавляют навеску исследуемого вещества. Раствор перемешивают в течение 15 мин с интенсивной продувкой инертным газом. Перед непосредственной регистрацией кривых барботи-

рование уменьшают до 1 пузырька в секунду и выключают мешалку. *Продувку газом необходимо проводить таким образом, чтобы предотвратить прилипание пузырьков на рабочей поверхности электродов.*

Ход работы

1. Вольтамперометрическое исследование на примере ферроцианида калия (III)

Пользуясь программным обеспечением NOVA 1.11 на рабочем столе, в предложенном окне программ выбирают Cyclic voltammetry potentiostatic (рис. 21) и выставляют следующие параметры:

Set potential	0,790 В
Wait time	0 с
Start potential	0,795 В
Upper potential	0,8 В
Lower potential	–0,6 В
Stop potential	0,795 В
Scan rate	0,1 В/с
Step potential	0,002 В

После установки необходимых параметров проверяют правильность подключения электродов к прибору и их погруженность в раствор. Затем нажимают окно START.

Данное измерение проводят минимум 5 раз.

В программе NOVA выбирают Analysis View, далее – просмотр данной кривой для определения потенциала тока пика восстановления. Для этого выбирают команду Add Analysis → Peak search → Manual/Automatic (рис. 22, 23). Позиция пика будет выводиться в таблице окна справа в столбце Peak position (рис. 23).

2. Хроноамперометрическое исследование на примере ферроцианида калия (III)

Пользуясь программным обеспечением NOVA 1.11 на рабочем столе, в предложенном окне программ NOVA выбирают Chronoamperometry ($\Delta t > 1$ ms) (рис. 24) и выставляют следующие параметры:

Set potential	выбирают потенциал за пиком восстановления на 0,05–0,1 В
Wait time	0 с
Duration	10 с
Interval time	0,1 с

После установки необходимых параметров проверяют правильность подключения электродов к прибору и их погруженность в раствор. Затем нажимают окно START.

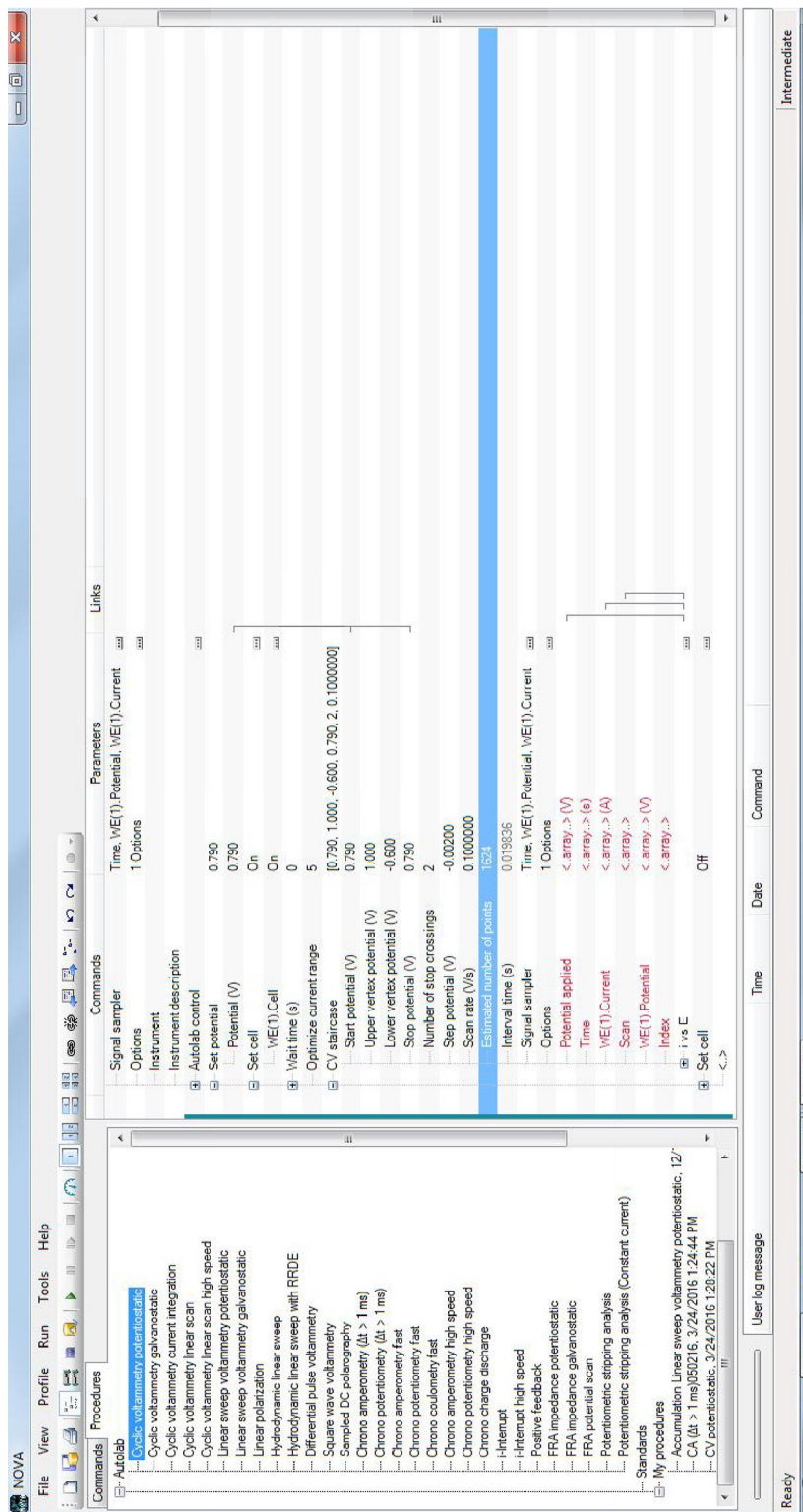


Рис. 21. Вид окна программы NOVA 1.11 для установки необходимых параметров

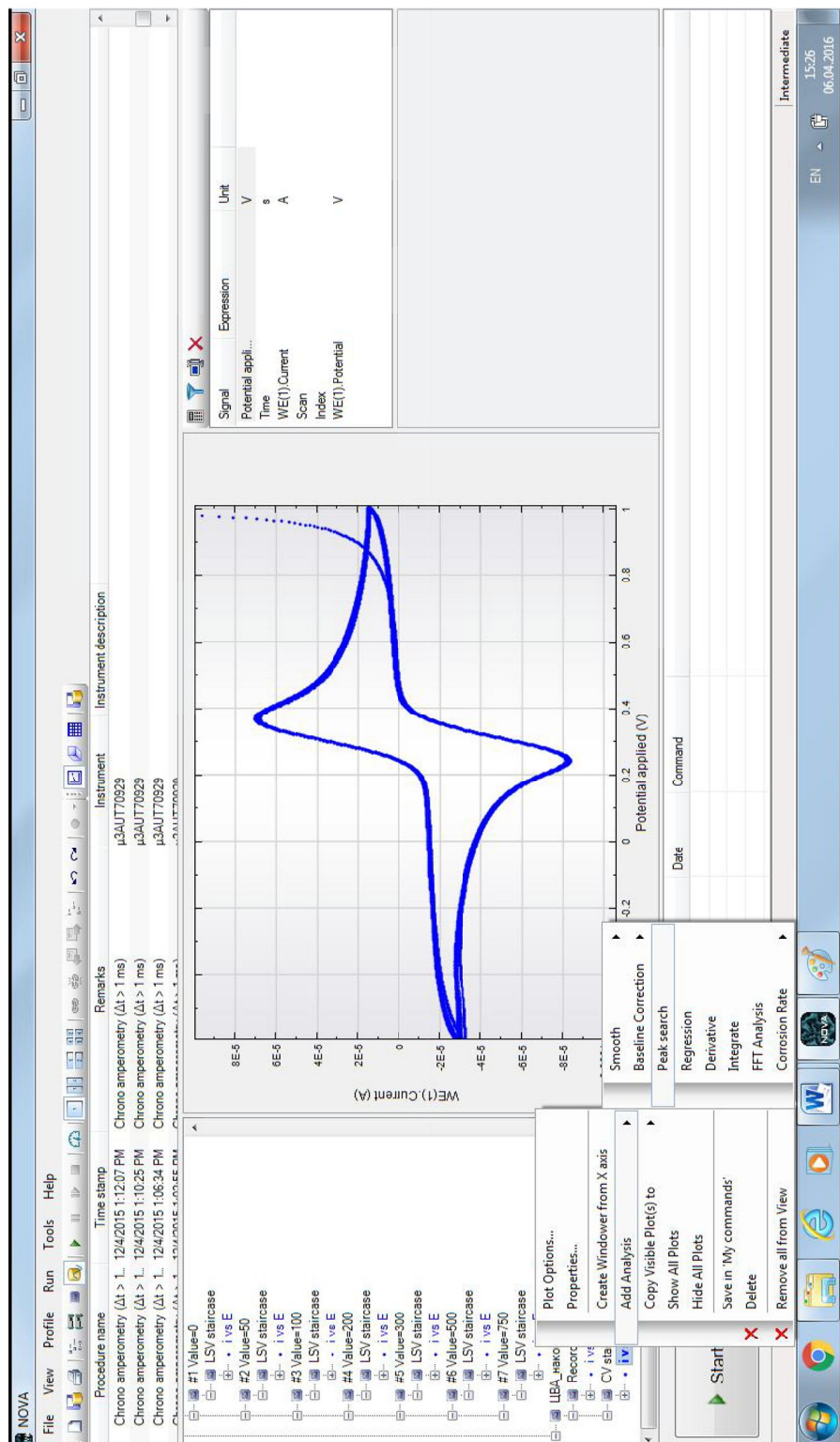


Рис. 22. Окно программы NOVA 1.11 для определения позиции тока пика восстановления ферроцианида (III) калия

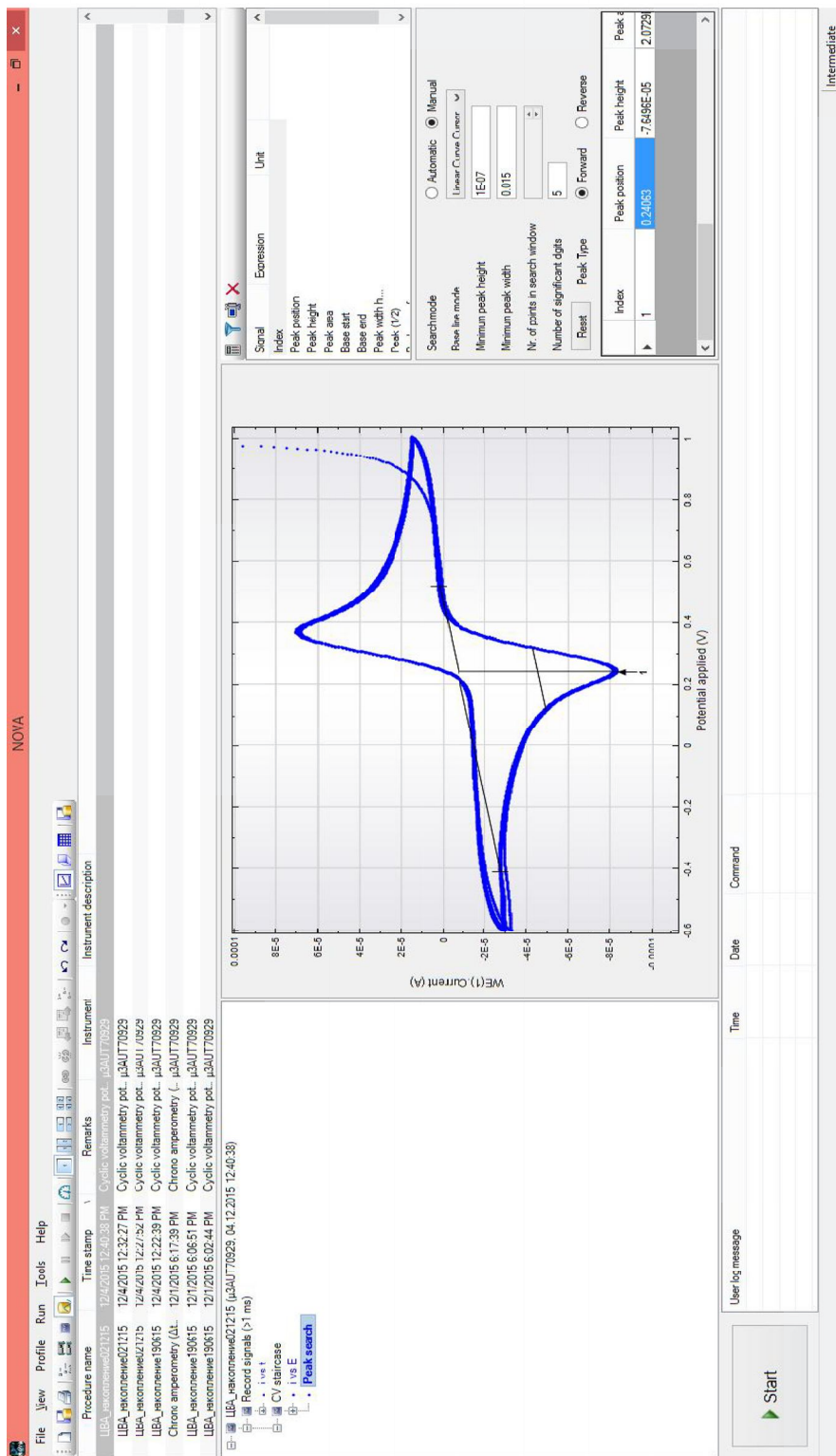


Рис. 23. Окно программы NOVA 1.11 для определения позиции тока пика восстановления ферроцианида (III) калия

Данное измерение проводят минимум 5 раз. *В случае если при наложении хроноамперограмм друг на друга зависимости не будут совпадать, следует провести повторные опыты и уделить внимание выбору потенциала накопления, чистке электрода и активной продувке раствора инертным газом.*

3. Вольтамперометрическое исследование препарата Триазавирин® и аскорбиновой кислоты

Вольтамперометрическое исследование препарата Триазавирин® и аскорбиновой кислоты выполняется аналогично исследованиям ферроцианида (III) калия с учетом следующих изменений:

1. Параметры для препарата Триазавирин®:

Set potential	0 В
Start potential	–0,05 В
Upper potential	0 В
Lower potential	–0,8 В
Stop potential	0 В

2. Параметры для аскорбиновой кислоты:

Set potential	0 В
Start potential	–0,05 В
Upper potential	0,8 В
Lower potential	0 В
Stop potential	0,8 В

Примечание. В случае если потенциал пика восстановления препарата Триазавирин® изменяется более чем на 0,1 В, следует еще раз продуть раствор инертным газом до стабилизации позиции пика. Регистрируемая зависимость представлена на рис. 25.

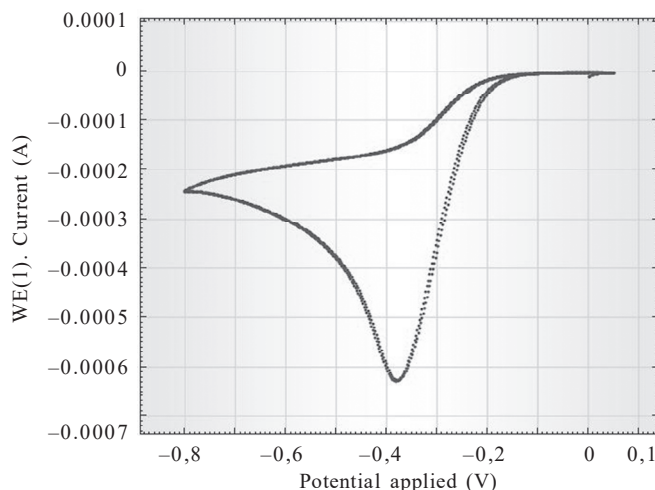


Рис. 25. Циклические вольтамперограммы препарата Триазавирин® ($5 \cdot 10^{-3}$ моль/л), зарегистрированные на СУ в буфере Бриттона–Робинсона с pH = 2 со скоростью развертки потенциала $0,05 \text{ В} \cdot \text{с}^{-1}$ от 0 до –0,8 В

Для аскорбиновой кислоты определяют потенциал тока пика окисления.

4. Хроноамперометрическое исследование препарата Триазавирин® и аскорбиновой кислоты

Хроноамперометрическое исследование препарата Триазавирин® и аскорбиновой кислоты проводят аналогично исследованию ферроцианида (III) калия.

Обработка полученных данных на примере ферроцианида калия (III).

В программе NOVA кликаем на активную панель Analysis View, находим просмотр данной зависимости для определения количества электричества, прошедшего через раствор. Для этого выбираем команду Add Analysis → Integrate (рис. 26). Диапазон интегрирования выставляем вручную от 1 до 2 с. Значение количества электричества будет выводиться в левом окне процедур под каждой интегрированной кривой (Integrate → Integrate plot → «Area=») (рис. 27). **Следует учесть, что возможен сдвиг по времени самого прибора.** Тогда кликаем левой кнопкой мыши в левом окне задач под i vs t по $X = \text{Time}$ и выбираем построение оси ординат Corrected time (рис. 28).

Примем, что количество электричества, прошедшего через раствор в случае модельной системы (ферроцианида калия (III)), эквивалентно 1 электрону. Тогда количество электронов, участвующих в электрохимическом превращении для аскорбиновой кислоты и препарата Триазавирин®, можно рассчитать по уравнению (6).

Результаты вычислений внести в таблицу. Представить виды регистрируемых зависимостей.

Исследуемое вещество	Интервал по времени интегрирования, с	Количество электричества, Кл	Количество электронов
Гексаноферрат (III) калия			
Аскорбиновая кислота			
Триазавирин®			

5. Вывод. Вывод должен содержать краткий обзор проделанной работы, ход ее выполнения и анализ полученных результатов.

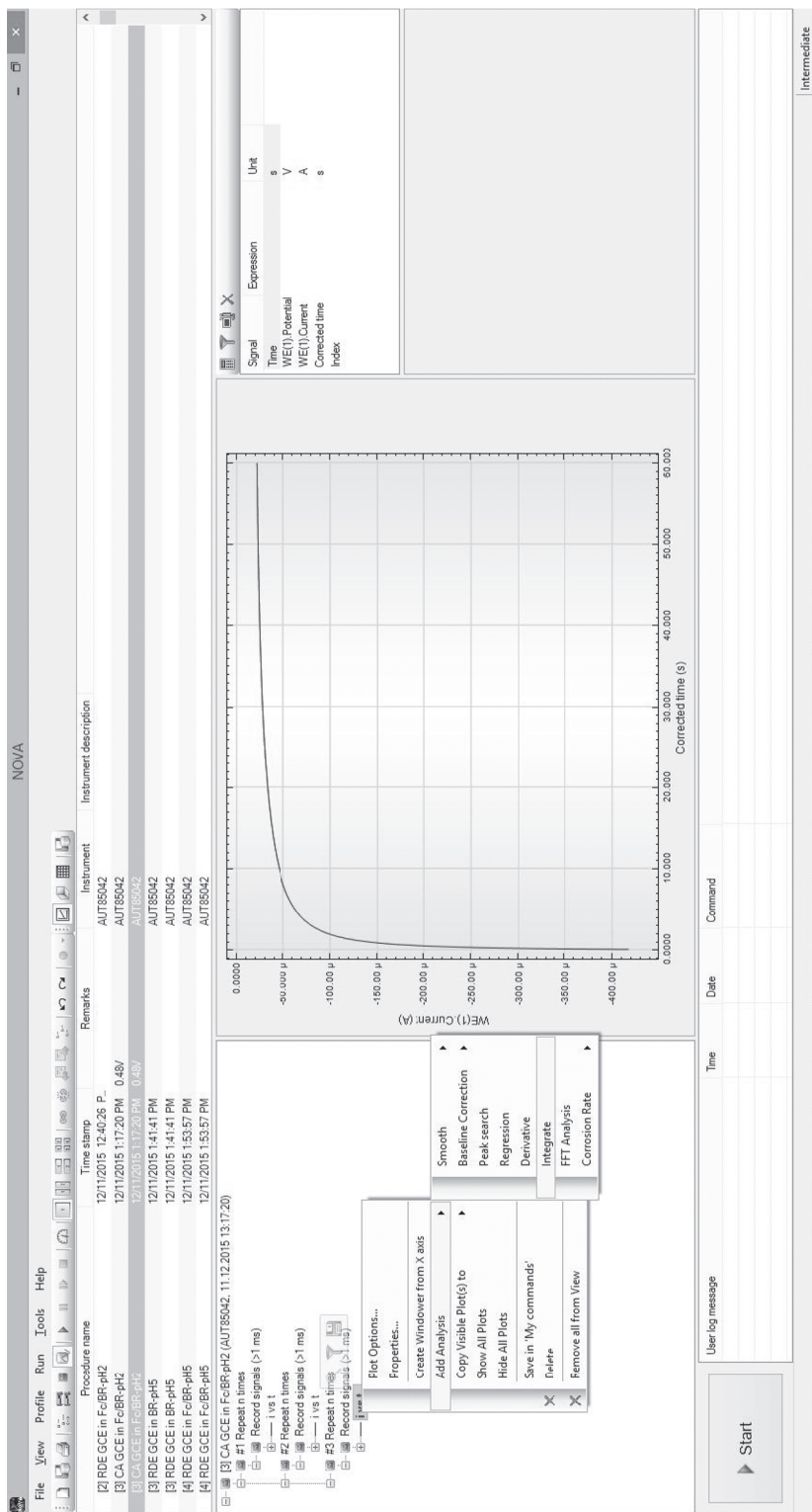


Рис. 26. Окно программы NOVA 1.11
для обработки полученных данных хроноамперометрии ферроцианида (III) калия

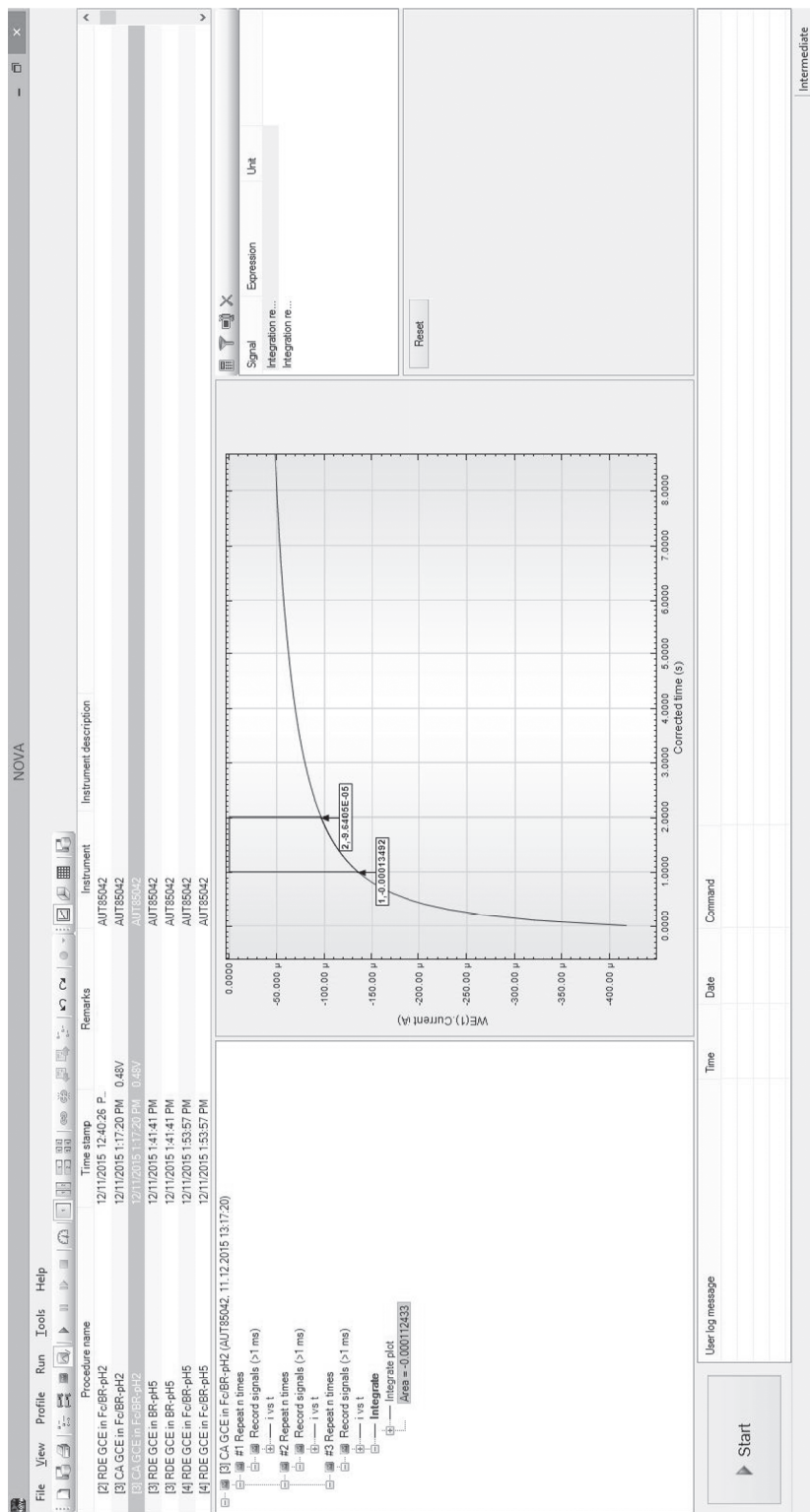


Рис. 27. Окно программы NOVA 1.11
для обработки полученных данных хроноамперметрии ферроцианида (III) калия

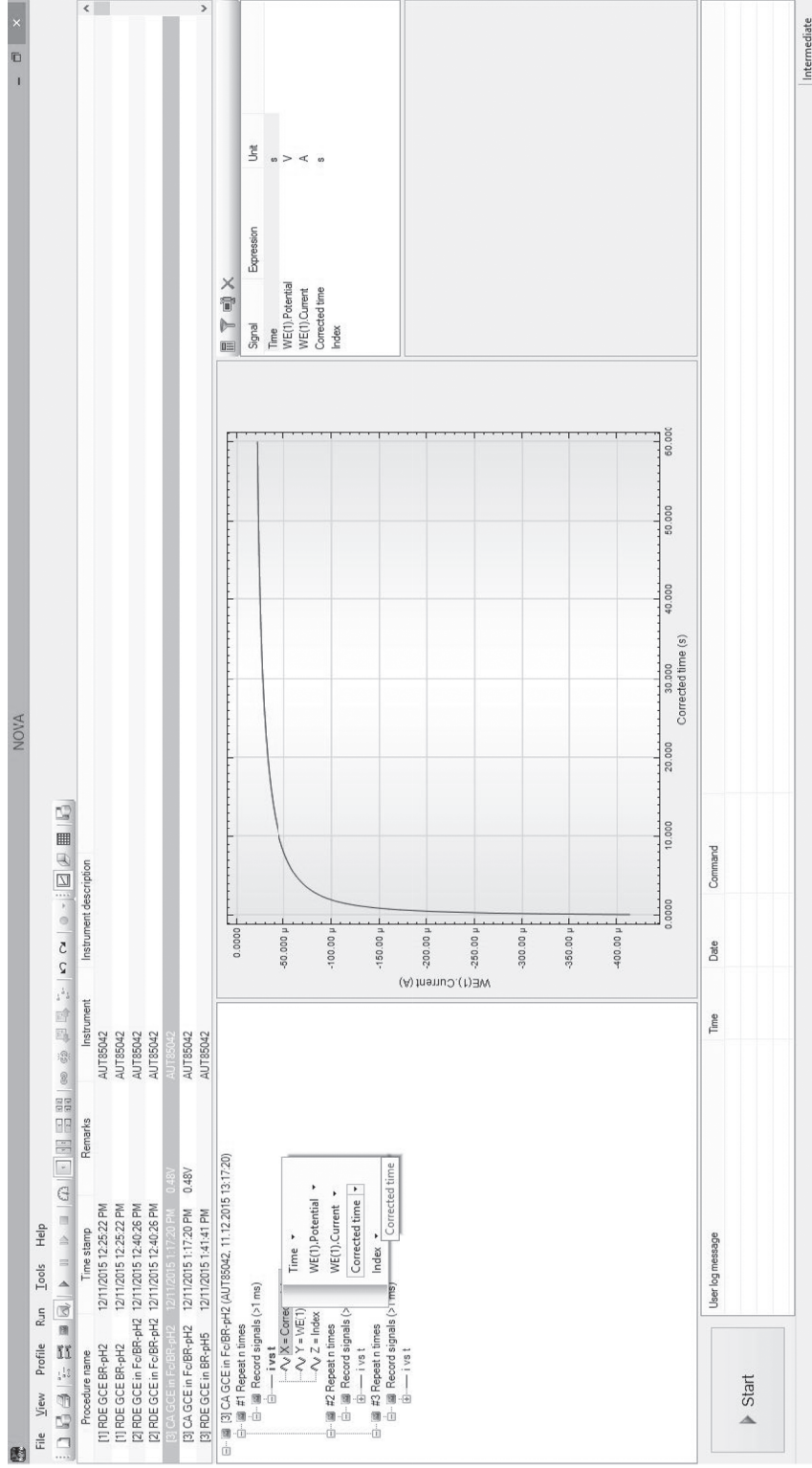


Рис. 28. Окно программы NOVA 1.11

для корректировки времени кривой построения полученных данных хроноамперометрии ферроцианида (III) калия

Лабораторная работа 3
**РЕГИСТРАЦИЯ РАДИКАЛА
В ПРЕПАРАТЕ ТРИАЗАВИРИН®
С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ЭХ-АНАЛИЗАТОРА
И ЭПР-СПЕКТРОМЕТРА**

Цель работы – освоение программно-аппаратного комплекса «ELEXSYS E500» в сочетании с комплексом «ИВА-5» и приобретение навыков регистрации короткоживущих радикалов, генерируемых методом инверсионной вольтамперометрии на примере препарата Триазавирин®.

Сущность метода определения

Электрохимическая часть эксперимента. Соединение Триазавирин® способно к окислительно-восстановительным (ОВ) превращениям в области потенциалов 0,4–0,6 В, а содержащаяся в структуре нитрогруппа способна также к электровосстановлению при потенциале – 0,25 В.

На основании ранее полученных экспериментальных данных и изученной литературы было выдвинуто предположение, что электровосстановление нитрогруппы действующего вещества препарата Триазавирин® протекает с образованием интермедиатов радикальной природы.

Ход работы

При линейно изменяющемся потенциале рабочего электрода регистрируют вольтамперограмму (графическую зависимость тока (I) от потенциала (E)). На вольтамперограмме находят и измеряют аналитический сигнал (АС) искомого элемента. Аналитический сигнал анион-радикала наблюдается при потенциале $-0,25 \pm 0,15$ В; АС (скачок тока) обусловлен процессом электровосстановления, происходящего с быстрым переносом электрона, за которым следует химическая реакция с последующим диффузионным отводом продуктов.

Процесс генерирования радикала в исследуемых образцах выполняется с использованием анализатора «ИВА-5».

На рис. 29 представлен программно-аппаратный комплекс, в состав которого входят анализатор «ИВА-5», электрохимическая ячейка с тремя электродами и компьютер.

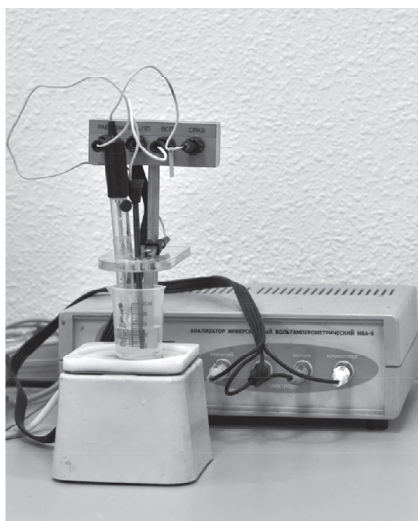


Рис. 29. Программно-аппаратный комплекс «ИВА-5»

Электрохимическая ячейка. В условиях вольтамперометрических измерений ток, протекающий через электрохимическую ячейку, зависит от потенциала рабочего электрода, который измеряется относительно электрода сравнения, имеющего постоянный потенциал. Чтобы избежать влияния сопротивления раствора на потенциал рабочего электрода, используют трехэлектродную систему. Дополнительный вспомогательный электрод сводит к минимуму влияние омического падения напряжения в растворе. В трехэлектродной ячейке через электрод сравнения ток не протекает.

Электрохимическая ячейка представляет собой электролизер (стеклянный капилляр) вместимостью 50 мкл с погруженными в него тремя электродами (рис. 30):

- индикаторным (рабочим) электродом – графитовым стержнем (диаметр 0,3 мм, длина 50 мм);
- электродом сравнения – хлоридсеребряным электродом;
- вспомогательным электродом – палладиевой проволокой.

ЭПР-спектроскопия. В жидкой фазе при исследовании короткоживущих радикалов используется комбинированная методика, которая заключается в следующем: непосредственно в резонаторе ЭПР-спектрометра в специальной ячейке протекает электрохимическая реакция, продукты которой предстоит изучить.

Объект анализа – Триазавирин[®], российский противовирусный препарат прямого действия семейства азолазинов; по заявлениям разработчиков, эффективен против 15 видов гриппа, включая вирус А/Н1N1 (свиного гриппа) и H5N1 (птичьего гриппа) на любой стадии болезни. Является синтетическим аналогом пуриновых нуклеозидов (гуанина).

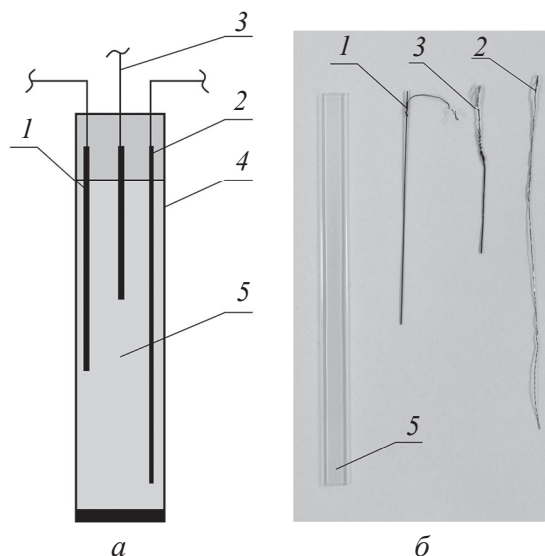


Рис. 30. Общий вид электролизера с цветовым индексом и точным уровнем объема (а).

Принципиальная схема ЭХ-ячейки (б):

1 – рабочий электрод (С); 2 – вспомогательный электрод (Pd); 3 – электрод сравнения (AgCl);
4 – исследуемый раствор; 5 – электролизер

Реактивы:

- растворы кислоты хлороводородной концентрацией 0,1 М;
- вода деионизированная;
- натрия 7-метило-3-нитро-4-оксо-1,4-дигидро[1,2,4]триа-золо[5,1-с]
[1,2,4]триазин-1-ид дигидрат, Триазавирин®.

Выполнение анализа

1. Приготовление исследуемого раствора

Для приготовления 1 мл раствора заданной концентрации 0,01М рассчитывают навеску сухого мелкокристаллического порошка Триазавирин® исходя из формулы

$$m = (C \cdot M) / V,$$

где m – масса навески (г); C – концентрация (М); M – молярная масса (г/моль); V – объем (мкл).

Известно, что молярная масса молекулы Триазавирин® составляет 286,19 г/моль.

Полученную навеску растворяют в 1 мл HCl 0,1М, при этом энергично перемешивают.

2. Подготовка электрохимической ячейки к выполнению измерений

Стеклянный капилляр (электролизер) перед и после проведения анализа промывают деионизированной водой. Electroды (индикаторный, вспомогательный, сравнения) также промывают деионизированной водой. Затем при помощи дозатора заполняют электролизер 50 мкл (до метки) исследуемым раствором. В основание помещают электрод сравнения и герметично запаивают термоклеем так, чтобы оставался контакт с токопроводящим проводом. Сверху электролизера поместить индикаторный и вспомогательный электроды таким образом, чтобы контакт между ними и электродом сравнения отсутствовал.

Получившуюся конструкцию аккуратно поместить в резонатор ЭПР-спектрометра, электроды подключить к токопроводящим проводам, ведущим к комплексу «ИВА-5».

3. Подготовка программно-аппаратного комплекса «ИВА-5» к работе

3.1. Включить компьютер.

3.2. На рабочем столе компьютера найти программу выполнения измерений «Iva the best» и щелкнуть по ярлыку два раза. Открывается окно программы.

Внешний вид и основные элементы пользовательского интерфейса программы показаны на рис. 31.

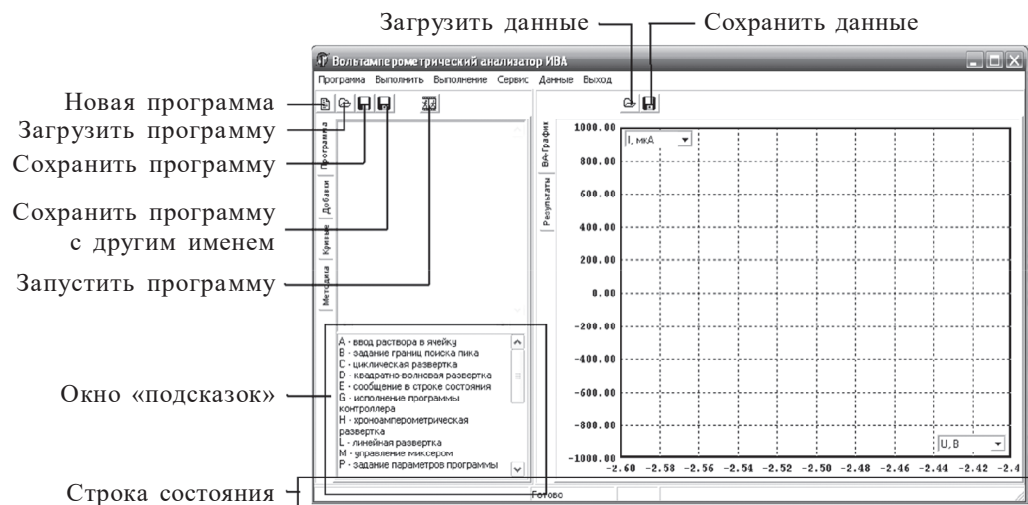


Рис. 31. Внешний вид главного окна и основные элементы пользовательского интерфейса программы «Iva the best»

3.3. Включить анализатор «ИВА-5» тумблером «сеть». При этом на передней панели анализатора загорается индикаторная лампа.

3.4. Подключить к разъему коллектора мешалки «срав» электрод сравнения (хлорсеребряный).

3.5. Подключить к разъему коллектора мешалки «всп» вспомогательный электрод (палладиевая проволока).

3.6. Подключить к разъему коллектора мешалки «раб. изм» рабочий электрод (графитовый стержень).

Хранят индикаторный электрод на воздухе в сухом виде. Между измерениями рабочую поверхность индикаторного электрода осторожно механически зачищают, а затем ополаскивают деионизированной водой.

4. Регистрация вольтамперограммы фонового раствора

4.1. В стеклянный капилляр (электролизер) помещают 50 мкл раствора соляной кислоты концентрацией 0,1М.

4.2. Снизу помещают электрод сравнения на глубину 1 см и герметично изолируют термоклеем.

4.3. Сверху помещают комплекс рабочего и вспомогательного электродов.

4.4. Далее подключают все электроды к соответствующим разъемам. Нажимают на значок «Загрузить данные» и выбирают соответствующую программу.

4.5. Запустить программу нажатием на соответствующий значок (см. рис. 14).

В соответствии с программой начинается процесс электрохимической регенерации, накопления, регистрации вольтамперных кривых.

Анализ проводят при следующих условиях:

скорость линейной развертки потенциала	0,05 В/с
интервал развертки потенциала	0,0 – (–0,60) В
потенциал максимума анодного тока	–0,25 ± 0,15 В

4.6. На дисплее компьютера в активном окне последовательно регистрируются три вольтамперные кривые.

5. Регистрация вольтамперограммы исследуемого раствора

5.1. В стеклянный капилляр (электролизер) помещают 50 мкл исследуемого раствора концентрацией 0,01 М.

Далее все в соответствии с п. 2–3 (с. 44) практической части.

5.2. В режиме подачи контроллеру параметров программы измерений или приема от него зарегистрированной вольтамперограммы левая часть строки состояния содержит индикатор процесса передачи данных, позволяющий оценивать степень завершенности выполняемой операции (рис. 32).



Рис. 32. Индикатор процесса передачи данных

5.3. Одновременно с окончанием процесса передачи данных приступают к регистрации ЭПР-спектров в соответствии с п. 3 (с. 20).

5.4. На дисплее компьютера в активном окне последовательно регистрируются три вольтамперные кривые (рис. 33).

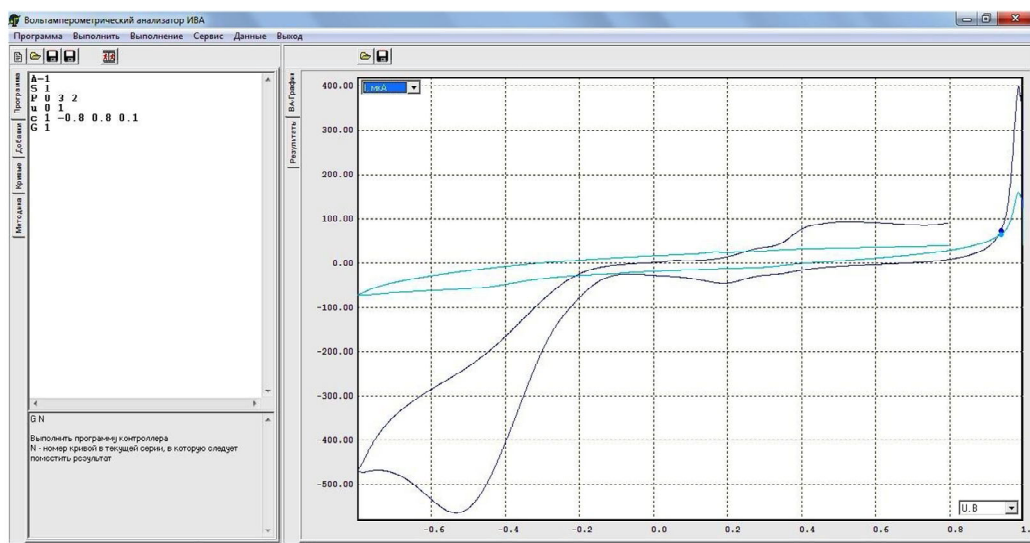


Рис. 33. Пример регистрации катодной вольтамперограммы в сравнении с сигналом фонового раствора

6. Выводы

В завершение делают вывод о корректности полученных результатов и о наличии катион-радикала. Результаты оформляют в отчет.

Лабораторная работа 4

РЕГИСТРАЦИЯ РАДИКАЛЬНОГО ИНТЕРМЕДИАТА МОЛЕКУЛЫ ПРЕПАРАТА ТРИАЗАВИРИН® МЕТОДОМ СПИНОВОЙ ЛОВУШКИ

Цель работы – приобретение навыков регистрации короткоживущих радикалов методом ЭПР-спектроскопии с использованием спиновых ловушек на примере препарата Триазавирин®.

Сущность метода определения

Спиновые ловушки – это химические вещества, способные реагировать с короткоживущими радикалами, образуя при этом стабильные парамагнитные соединения – спиновые аддукты. Спиновые ловушки применяются для изучения различных процессов, протекающих с участием свободных радикалов. Присутствие спиновых аддуктов в исследуемых системах легко детектируется методом ЭПР-спектроскопии.

При использовании спиновых ловушек в эксперименте регистрируется не исходный радикал, а его аддукт, т. е. продукт реакции спиновой ловушки и радикала. Использование прямых измерений всегда является предпочтительным, однако часто данный метод – единственная возможность регистрации короткоживущих нестабильных радикалов. Важнейшей задачей в исследованиях, выполняемых методом ЭПР с использованием спиновых ловушек, является идентификация исследуемого соединения и механизма его образования, поскольку ошибки на этом этапе могут привести к некорректной интерпретации полученной информации.

На данный момент существует множество спиновых ловушек, все они различаются по свойствам и стоимости.

Идеальная спиновая ловушка должна удовлетворять следующим требованиям:

- быстро реагировать с широким рядом радикалов;
- в результате реакции образовывать стабильные аддукты;
- обладать устойчивостью по отношению к освещению, повышенной температуре, а также к воздействию различных химических и биохимических компонентов, включая ферменты;
- образовывать аддукты, которые с легкостью поддаются экстракции, сепарации и полному описанию;

– легко синтезироваться в чистом виде, а также в формах, включающих изотопы;

– быть нетоксичными и физиологически инертными.

Ни одна из существующих спиновых ловушек не обладает всеми вышеперечисленными качествами, поэтому выбор определяется каждой конкретной ситуацией.

В данной работе будет использоваться спиновая ловушка ТМТ-Н (рис. 34).

Объект анализа – интермедиаты радикальной природы, образованные при электровосстановлении препарата Триазавирин®.

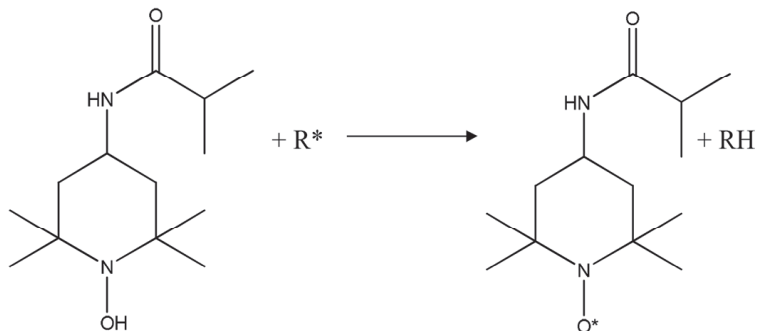


Рис. 34. Механизм образования спинового аддукта

Реактивы:

- растворы кислоты хлористоводородной концентрацией 0,1М;
- вода деионизированная;
- натрия 7-метило-3-нитро-4-оксо-1,4-дигидро[1,2,4]триа-золо[5,1-с][1,2,4]триазин-1-ид дигидрат, Триазавирин®;
- N-(1-гидрокси-2,2,6,6-тетраметилпиперидин-4-ил)-2-метил-пропанамид гидрохлорид (ТМТН).

Выполнение анализа

1. Приготовление исследуемого раствора

Для приготовления 1 мл раствора заданной концентрации 0,01М рассчитывают навеску сухого мелкокристаллического порошка Триазавирин® исходя из формулы

$$m = (C \cdot M) / V,$$

где m – масса навески (г); C – концентрация (М); M – молярная масса (г/моль); V – объем (мл).

Известно, что молярная масса молекулы Триазавирин® составляет 286,19 г/моль.

Полученную навеску растворяют в 1 мл $\text{HCl } 0,1\text{M}$, при этом энергично перемешивают. К приготовленному раствору добавляют навеску спиновой ловушки ТМТ-Н. Навеску рассчитывают из соотношения 1 : 5 к навеске Триазавирин[®].

2. Регистрация вольтамперограммы исследуемого раствора

Из полученной вольтамперограммы находят потенциал пика восстановления.

3. Генерация радикалов

Производят генерацию радикалов в течение 3 и 7 мин при потенциалах: в области пика восстановления и $\pm 0,1$ В от этой области. В растворы добавляют спиновую ловушку.

4. Регистрация ЭПР-спектров

Полученные растворы отбирают в стеклянный капилляр и закупоривают. Капилляр помещают в кварцевую ячейку, которую затем устанавливают в резонатор спектрометра и регистрируют ЭПР-спектры в соответствии с п. 3 параграфа 2 (с. 20) данного пособия. Затем проводят математическую обработку полученного спектра и получают значения молярной концентрации и количества парамагнитных частиц в растворе.

Лабораторная работа 5

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ПРОГРАММНОГО МОДУЛЯ EASYSPIN ДЛЯ МОДЕЛИРОВАНИЯ СПЕКТРОВ ЭПР

Цель работы – освоить основы работы с программным модулем EasySpin для симулирования ЭПР-спектров различных соединений.

Сущность метода

Спектроскопические методы магнитного резонанса на сегодняшний день используются в очень широкой области научных исследований. Это и физика, и химия, и биология, и стремительно развивающаяся сфера нанотехнологий. Магниторезонансные методы можно смело отнести к наиболее информативным экспериментальным методам исследования веществ в твердой и жидкой фазах, в упорядоченном (монокристаллы) и разупорядоченном (порошок, стекло, жидкость) состояниях. Соответственно разнообразию объектов изучения развивались и развиваются методы анализа измеряемых спектров.

Еще сравнительно недавно исследования методом ЭПР были связаны либо с громоздкими аналитическими расчетами, да и то, как правило, в низших порядках теории возмущений, либо с написанием специальных программ, предназначенных для анализа спектров конкретной системы. На сегодняшний день вследствие быстрого развития вычислительной техники и разнообразных программных пакетов появилась возможность создания универсальных программ, предназначенных для анализа спектроскопической информации и расчета энергетической структуры всевозможных парамагнитных комплексов. Одним из таких программных продуктов является свободно распространяемый модуль EasySpin, представляющий собой набор подпрограмм, работающих в пакете Matlab. Данный модуль написан и развивается доктором Стефаном Столлом (Dr. Stefan Stoll, США) [4].

Работа с модулем EasySpin. Модуль EasySpin устанавливается в пакете Matlab. Скачивается модуль из ресурса easyspin.org по адресу: <http://www.easyspin.org>. Ссылка при использовании модуля на авторов обязательна. Данный модуль распространяется бесплатно.

В состав модуля входят подпрограммы, предназначенные для расчета спектров, соответствующих основным теоретическим моделям. Некоторые из таких программ:

– *garlic* – стационарный ЭПР изотропных парамагнитных центров или в условиях быстрого движения молекул;

- chili – стационарный ЭПР в условиях медленного движения молекул;
- pepper – стационарный ЭПР в твердом теле;
- salt – двойной электронно-ядерный резонанс (ДЭЯР, или ENDOR) в твердом теле;
- saffron – импульсный ЭПР/ДЭЯР в твердом теле.

Кроме того, в модуле EasySpin введены некоторые сервисные возможности. Например, в состав модуля входят справочник по физике ЭПР, справочник по математике тензоров, калькулятор вычисления g -фактора, постоянных СТВ, диаграмм энергетических уровней, справочные таблицы изотопов и др. [5].

Наиболее востребованным для комбинированных методов анализа представляется изучение ЭПР спектров жидкостей. Поэтому в качестве примера мы рассмотрим возможности симулирования спектров с помощью процедуры *garlic*. Другие подпрограммы из набора процедур EasySpin выполнены в подобном же интерфейсе. Данная функция позволяет рассчитывать спектры для одного неспаренного электрона и произвольного числа ядер. В изотропном случае резонансные поля вычисляются точно, без использования теории возмущений, диапазон значений магнитного поля определяется автоматически. Для быстрого движения задаются время корреляции вращений и тензор анизотропии, ширина линий вычисляется автоматически. Включены эффекты квадрупольного взаимодействия.

Вид процедуры:

garlic(Sys,Exp);

Процедура вызывается двумя аргументами. Параметр Sys описывает моделируемую спиновую систему, а аргумент Exp содержит экспериментальные параметры.

В общем случае процедура строит симулированный спектр, но можно вывести симулированный спектр в файл с массивом данных магнитного поля и соответствующим массивом интенсивности поглощения:

[Field,Spec] = *garlic*(Sys,Exp);

Для описания спиновой системы используются следующие переменные:

Sys.g = 2,006;

Sys.Nucs = '1H';

Sys.A = 15; % MHz

Sys.n = 2;

Sys.lwpp = 0,05; % mT

Первое выражение определяет изотропное значение g -фактора спиновой системы, в случае примера 2,006. Процедура *garlic always* предполагает один неспаренный электрон со спином $S = 1/2$.

Поле Sys.Nucs содержит строку, содержащую информацию о взаимодействующих с электроном ядер с магнитным моментом. Пример предпола-

гает, что взаимодействуют протоны. В общем случае формируется выражение с перечислением всех неэквивалентных ядер с магнитным моментом, взаимодействующих с электроном. Например, выражение

```
Sys.Nucs = '1H,1H,14N';
```

описывает два различных протона и один атом азота.

Переменная Sys.A вводит численное значение постоянной сверхтонкого взаимодействия, выраженную в МГц, для каждого ядра, описанного в выражении для Sys.Nucs. Следующие выражения определяют постоянную СТВ для протона 10 МГц и для азота 12 МГц:

```
Sys.Nucs = '1H,13C';
```

```
Sys.A = [10 12]; % MHz
```

Следует знать, что данные в процедуре garlic (как и в других процедурах симулирования) используют значения СТВ, выраженные в МГц. В литературе часто используются другие единицы измерения (Гс или мТл). При заданном значении g (например, 2,8025) перевод величин соответствует $1 \text{ Гс} = 2,8025 \text{ МГц} = 0,1 \text{ мТл}$.

Задачу перевода величин в МГц в пакете EasySpin выполняет подпрограмма mt2mhz:

```
A_MHz = mt2mhz(A_mT); % mT -> MHz conversion
```

```
A_MHz = mt2mhz(A_G/10); % G -> MHz conversion (1 G = 0,1 mT)
```

Переменная Sys.n задает количество эквивалентных ядер, взаимодействующих с электроном в моделируемой системе:

```
Sys.Nucs = '1H';
```

```
Sys.n = 1;
```

```
Sys.A = 5.3;
```

Приведенные выше выражения описывают один протон в системе, а в примере

```
Sys.Nucs = '1H';
```

```
Sys.n = 2;
```

```
Sys.A = 5.3;
```

в модели взаимодействуют два эквивалентных протона, постоянная СТВ которых одинакова и равна 5,5 МГц. В выражении

```
Sys.Nucs = '1H,1H';
```

```
Sys.n = [4 4];
```

```
Sys.A = [14 5];
```

указаны две группы протонов по четыре эквивалентных ядра с постоянными СТВ 14 и 5 МГц (например, в анион-радикале нафталина).

Переменная Sys.lwpp устанавливает ширину линии от пика к пику.

Далее рассмотрим, как описываются параметры эксперимента, которые входят во второй аргумент процедуры garlic.

Переменная Exp.mwFreq. Для симулирования ЭПР-спектра необходимо задать частоту спектрометра, выраженную в ГГц:

Exp.mwFreq = 9,385; % X-band

Exp.mwFreq = 34,9; % Q-band

Также необходимо задать диапазон сканирования магнитного поля. В процедуре имеется возможность сделать это двумя способами. Первый – задать диапазон сканирования и центральное значение поля. Другой способ – задать минимальное и максимальное значения магнитного поля. Следует помнить, что задаются величины, выраженные в мТл.

Exp.CenterSweep = [340 80]; % in mT

Exp.Range = [300 380]; % in mT

Во многих CW-спектрометрах диапазон сканирования магнитного поля задается первым способом.

Exp.CenterSweep и Exp.Range являются опциональными переменными. EasySpin автоматически определяет диапазон изменения поля, где симулируется полный спектр.

Другим опциональным параметром является Exp.nPoints.

Количество точек регистрации. По умолчанию данный параметр задан 1024 точками.

Exp.nPoints = 512

Следующий параметр, задающий эксперимент, – Exp.Harmonic. Величина этого поля определяет функцию измеряемого сигнала. Если параметр установлен равным 0, тогда спектрометр регистрирует непосредственно спектр поглощения образца; если установлен 1, тогда регистрируется первая производная, 2 означает регистрацию второй производной. По умолчанию параметр установлен для измерения первой производной. Таким образом, поле Exp.Harmonic задается, если мы непосредственно измеряем спектр поглощения, или его вторую производную:

Exp.Harmonic = 0; % absorption spectrum, direct detection

Exp.Harmonic = 1; % first harmonic (default)

Exp.Harmonic = 2; % second harmonic

Амплитуда модуляции. Для отражения эффектов, связанных с перемодуляцией, необходимо данный параметр установить, величина задается в мТл:

Exp.ModAmp = 0.2; % 0.2 mT (2 G) modulation amplitude, peak-to-peak

Постоянная времени. Поле влияет на отображаемый спектр. Для учета влияния постоянной времени тракта измерения необходимо применять дополнительную процедуру rcfilt.

Используются дополнительные экспериментальные установки в задании экспериментальных параметров.

Эффекты поляризации образцов при низкой температуре включаются в моделирование параметром Exp.Temperature:

Exp.Temperature = 4,2; % temperature in kelvin

Дополнительно с предыдущей установкой EasySpin включает соответствующие факторы поляризации, возникающие из термического равновесия заселенности энергетических уровней. Но для систем $S = 1/2$ эта величина избыточна. Для многоспиновых систем это важно из-за большого нулевого поля расщепления и сильного спин-спинового взаимодействия.

Уширение линий. В EasySpin существует два способа описания уширения линий ЭПР: для изотропного и анизотропного случаев. В случае изотропной ширины каждому вычисленному значению резонансного поля ставится в соответствие линия в спектре с формой Гаусса или Лоренца и с заданной пользователем шириной. Такой метод определения является простейшим, он не предполагает никаких физических оснований уширения и носит название «феноменологический». Параметры уширения задаются в структуре Sys с помощью заполнения соответствующих полей.

Поле `lwpp` – определяет ширину линии peak-to-peak в мТл.

Представляет собой характеристику ширины линии, равную горизонтальному расстоянию между максимумом и минимумом первой производной линии поглощения; если указывается одно значение, то форма линии считается гауссовой, в общем случае – ряд из двух значений [Gauss Lorentz]. Например,

`Sys.lwpp = 10`; – гауссова форма в мТ;

`Sys.lwpp = [0 12]`; – лоренцева форма в мТ;

`Sys.lwpp = [10 12]`; – форма линии типа Фойхт в мТ.

Поле `lw` – полная ширина на половине высоты линии в мТл (иногда обозначается как FWHM – full width at half maximum).

Важно понимать, что при измерении ширины первой производной спектра поглощения FWHM не ширина от пика до пика и необходимо использовать переменную `Sys.lwpp`.

Следует отметить, что значения по умолчанию для полей, ответственных за ширину линии ЭПР в симулируемом спектре, не заданы, в любом случае одно из полей должно быть заполнено.

Часто, особенно это характерно для экспериментов с большим числом реагентов, наша спиновая система состоит из нескольких спиновых систем, смешанных в определенных концентрациях. Процедура `garlic` позволяет симулировать суммарный спектр ЭПР. Ниже приведен простейший пример смеси из двух компонент в соотношении молярных концентраций образующих спиновых систем 2 : 1.

`Sys1.g = 2`;

`Sys1.lwpp = 1`;

`Sys1.weight = 2`;

`Sys2.g = 2.1`;

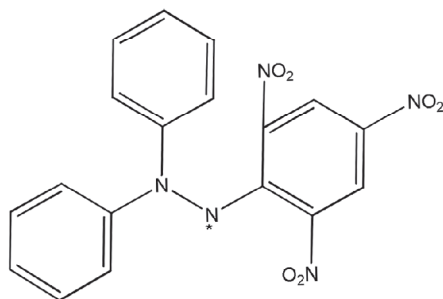
`Sys2.lwpp = 0.8`;

`Sys2.weight = 1`;

```
Exp.mwFreq = 9.5;  
Exp.Range = [300 360];  
garlic({Sys1,Sys2},Exp);
```

Следует отметить, что не нужно указывать Sys.weight, если он отсутствует, предполагается, что он равен 1. Эти веса являются абсолютными, т. е. симуляция с Sys.weight = 20 дает спектр, который в 10 раз более интенсивный, чем тот, который получен с Sys .Weight = 2. Число элементов в симуляции не ограничено.

З а д а н и е. Предлагается выполнить симуляцию спектра ЭПР ДФПГ 2,2-дифенил-1-пикрилгидразил.



Для выполнения работы экспериментальные параметры необходимо выгрузить в программе Херг из файла с зарегистрированным спектром ДФПГ на установке «ELEXSYS E500», записанным на компьютер в процессе выполнения лабораторной работы 1 «Определение антирадикальной активности индивидуальных антиоксидантов методом ЭПР-спектроскопии». Файл находится в папке Experiments.

Величину постоянных СТВ и ширину спектральных линий зарегистрированного спектра ДФПГ необходимо измерить с помощью встроенных инструментов программы Херг.

Для симуляции ЭПР-спектра ДФПГ необходимо загрузить компьютер и запустить пакет Matlab, создать файл и выполнить описанные выше команды с данными эксперимента и спиновой системы ДФПГ. Программа выведет на экран дисплея симулированный спектр ЭПР.

Сравнить зарегистрированный и симулированный спектры ДФПГ, сделать вывод о применимости модели ЭПР, используемой в модуле EasySpin.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЕ ССЫЛКИ

1. Кукаев Е. Н., Куксин А. Ю., Тишкина А. О. Спектрометрия электронного парамагнитного резонанса : учеб.-метод. пособие. М. : Изд-во МФТИ, 2014. 38 с.

2. Методы ЭПР и ЯМР в органической и элементоорганической химии : учеб.-метод. пособие / В. К. Черкасов, Ю. А. Курский, К. А. Кожанов и др. Нижний Новгород : Изд-во НГУ, 2010. 54 с.

3. *Ralph T. Weber, JinJie Jiang*. ELEXSYS II E 500 User's Guide. Billerica, MA USA : Bruker BioSpin Corporation, 2013. 374 с.

4. Использование программного модуля EasySpin в анализе спектров магнитного резонанса. Ч. 1 : Стационарный ЭПР : учеб.-метод. пособие / Г. В. Мамин, С. Б. Орлинский, Н. И. Силкин и др. Казань : Изд-во КФУ, 2010. 31 с.

5. *Stoll S., Schweiger A.* EasySpin, a comprehensive software package for spectral simulation and analysis in EPR. [S. l.] : J. Magn. Reson. 2006. 178(1). С. 42–55.

СПИСОК РЕКОМЕНДУЕМОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

Будников Г. К. Основы современного электрохимического анализа / Г. К. Будников, В. Н. Майстренко, М. Р. Вяселев. – М. : Мир, 2003. – 592 с.

Васильев В. П. Аналитическая химия. Кн. 2 : Физико-химические методы анализа : учеб. / В. П. Васильев. – М. : Дрофа, 2002. – 368 с.

Вертц Дж. Теория и практические приложения метода ЭПР / Дж. Вертц, Дж. Болтон. – М. : Мир, 1975. – 543 с.

Гейровский Я. Основы полярографии / Я. Гейровский, Я. Кута. – М. : Мир, 1965. – 358 с.

Дамаскин Б. Б. Введение в электрохимическую кинетику / Б. Б. Дамаскин, О. А. Петрий. – М. : Высш. шк., 1975. – 456 с.

Золотов Ю. А. Основы аналитической химии : в 2 кн. – Кн. 2 : Методы химического анализа : учеб. / Ю. А. Золотов, Е. Н. Дорохова В. И. Фадеева и др. ; под ред. Ю. А. Золотова. – М. : Высш. шк., 1999. – 494 с.

Кутьин Ю. С. Настройка спектрометра X-диапазона фирмы Брукер серии Elexsys и измерение спектров ЭПР в стационарном режиме : метод. пособие / Ю. С. Кутьин, Г. В. Мамин, С. Б. Орлинский и др. – Казань : Изд-во КФУ, 2010. – 35 с.

Юинг Г. Инструментальные методы химического анализа / Г. Юинг. – М., 1991. – 608 с.

Stoll S. EasySpin, a comprehensive software package for spectral simulation and analysis in EPR / S. Stoll, A. Schweiger. – [S. l.] : J. Magn. Reson. – 2006. – 178(1). – С. 42–55.

У ч е б н о е и з д а н и е

Козицина Алиса Николаевна
Иванова Алла Владимировна
Цмокалюк Антон Николаевич
Петров Александр Сергеевич
Глазырина Юлия Александровна
Ивойлова Александра Всеволодовна

ЭПР-СПЕКТРОСКОПИЯ,
ЭЛЕКТРОХИМИЧЕСКИЕ
И КОМБИНИРОВАННЫЕ
МЕТОДЫ АНАЛИЗА

Учебно-методическое пособие

Заведующий редакцией *М. А. Овечкина*
Редактор *Т. А. Федорова*
Корректор *Т. А. Федорова*
Компьютерная верстка *Г. Б. Головина*

Подписано в печать 26.07.18. Формат 70×100/16.
Бумага офсетная. Цифровая печать.
Уч.-изд. л. 3,6. Усл. печ. л. 4,8. Тираж 50 экз. Заказ 220.

Издательство Уральского университета.
Редакционно-издательский отдел ИПЦ УрФУ
620083, Екатеринбург, ул. Тургенева, 4.
Тел.: +7 (343) 389-94-79, 350-43-28
E-mail: rio.marina.ovechkina@mail.ru

Отпечатано в Издательско-полиграфическом центре УрФУ
620083, Екатеринбург, ул. Тургенева, 4.
Тел.: +7 (343) 358-93-06, 350-58-20, 350-90-13
Факс +7 (343) 358-93-06
<http://print.urfu.ru>

ДЛЯ ЗАМЕТОК

